

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

# **Reprogrammierung von Rezeptorsignalwegen des angeborenen Immunsystems zur Stärkung der Tumorthherapie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Laurin Rötzer

aus Starnberg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin

Mitberichterstatte: Prof. Dr. med. Tobias Feuchtinger

Prof. Dr. med. Dominik Rüttinger

Prof. Dr. med. Martin Dichgans

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Christian Hotz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2017

Meinen Eltern



# INHALT

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Die Entwicklung der Tumorimmuntherapie .....	3
1.2. Pattern Recognition-Rezeptoren .....	5
1.2.1. Toll-like-Rezeptoren.....	6
1.2.2. RIG-I-like-Helicases (RLH).....	8
1.2.3. Überblick über die Signalwege.....	9
1.2.4. Wechselwirkungen zwischen PRR.....	9
1.2.5. Sensitivierung.....	10
1.2.6. Tachyphylaxie .....	10
1.3. Tumor-Immuntherapie mit PRR-Agonisten .....	12
1.3.1. Das Prinzip der Tumor-Immuntherapie mit PRR-Agonisten .....	12
1.3.2. R848 und poly(I:C) als Adjuvantien in der Tumor-Immuntherapie .....	13
1.3.3. Aktuelle Entwicklungen .....	15
1.4. Fragestellung.....	17
 <b>2. Material und Methoden.....</b>	 <b>19</b>
2.1. Materialien .....	21
2.1.1. Technische Ausstattung.....	21
2.1.2. Chemikalien.....	21
2.1.3. Materialien.....	22
2.1.4. Puffer .....	22
2.1.5. Kits.....	23
2.1.6. Antikörper .....	23
2.1.7. Medien.....	24
2.2. Methoden .....	25

2.2.1. Zellkultur .....	25
2.2.2. Magnetic Cell Separation (MACS) .....	26
2.2.3. Flow Cytometry .....	26
2.2.4. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	26
2.2.5. Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	27
2.2.6. Stimulation von RIG-I mit ppp-RNA .....	28
2.2.7. Tierexperimentelle Methoden.....	29
2.2.8. Statistische Methoden .....	30
 <b>3. Ergebnisse</b> .....	 31
3.1. Grundlagen der Sequentiellen Stimulation von PRR.....	33
3.1.1. Präkonditionierung mit poly(I:C) führt zu einer verstärkten Antwort auf R848: <i>Priming</i> Effekt.....	33
3.1.2. Plasmazytoide dendritische Zellen werden zusätzlich für die IFN-Sekretion sensitiviert.....	35
3.1.3. Konditionierung mit poly(I:C) führt zu einer verminderten Antwort auf ppp-RNA: <i>Blocking</i> -Effekt .....	37
3.1.4. Präkonditionierung mit poly(I:C) führt auch in vivo zu einer Reprogrammierung der Immunantwort .....	39
3.1.5. Der Priming-Effekt führt zu einer höheren Expression von DC- Aktivierungsmarkern.....	41
3.2. Mechanismen der sequentiellen Stimulation von PRR.....	42
3.2.1. Die Reprogrammierung ist auch in MDA5-, TRIF- und PKR-Knockout-Zellen zu beobachten .....	42
3.2.2. Das Genexpressionsmuster verändert sich durch die Stimulation mit poly(I:C) ähnlich wie mit IFN- $\alpha$ .....	43
3.2.3. Die Reprogrammierung und ihre Abhängigkeit von löslichem IFN- $\alpha$ und IFN- $\beta$ .....	46

3.3.	Sequentielle Stimulation von PRR in der Tumorthherapie .....	50
3.3.1.	Die sequentielle Therapie ist nicht lebertoxischer als die Einzelsubstanzen .....	51
3.3.2.	Der Priming-Effekt lässt sich für eine effektive Anti-Tumor-Therapie nutzen .....	52
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>55</b>
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	57
4.2.	Reprogrammierung von Rezeptorsignalwegen der angeborenen Immunität .....	59
4.2.1.	Reprogrammierung durch Regulierung von Signalwegen .....	59
4.2.2.	Reprogrammierung durch Regulierung der Translokation .....	61
4.2.3.	Beteiligung von bislang unbekannten Rezeptoren an der Reprogrammierung.....	62
4.2.4.	Einfluss von Interferonen .....	63
4.2.5.	Physikalische Effekte.....	64
4.2.6.	Eigenschaften des verwendeten poly(I:C) .....	64
4.2.7.	Die Reprogrammierung im Kontext einer Infektion .....	65
4.3.	Sequentielle PRR-Stimulation und Tumorimmuntherapie.....	68
4.4.	Ausblick.....	70
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>93</b>
<b>10.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>95</b>





## 1. EINLEITUNG



## 1.1. DIE ENTWICKLUNG DER TUMORIMMUNTHERAPIE

Schon 1890 konnte Coley demonstrieren, dass das Einbringen von Bakterien des Stammes *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) zu einem Größenrückgang inoperabler Tumore führen kann. Als Konsequenz vermutete man, das Immunsystem könne eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumoren spielen: Durch das Einbringen von Bakterien würde eine lokale Immunreaktion ausgelöst, die neben den Pathogenen auch den Tumor bekämpfe. Dass BCG und andere Immunstimulanzien einen therapeutischen Effekt auf Tumore haben können, bestätigte sich einige Jahrzehnte später (Nauts et al. 1953). BCG wird bis heute als lokale, aber effektive Therapie des Blasenkarzinoms eingesetzt (Kawai et al 2013).

Ein wichtiger Schritt in die moderne Tumorimmunologie war die Entdeckung, dass Mäuse aus Inzuchtlinien gegen einen chemisch induzierten Tumor durch Instillation von lysierten Tumorzellen aus genetisch identischen Tieren immunisiert werden können (Gross 1943). Prehn und Main konnten etwas später zeigen, dass es eine spezifische Immunität gegen einen Tumor gibt: Gesunde Hauttransplantate der Maus, von der der Tumor stammte, wurden in den Empfängertieren – im Gegensatz zu Tumortransplantaten – weder abgestoßen, noch konnten sie eine Immunität gegen den Tumor auslösen (Prehn, Main 1957). Die Beobachtung, dass eine Tumorabstoßung unabhängig vom Ursprung des Tumors (chemisch, physikalisch oder spontan) erfolgen kann, führte zur Hypothese, dass jeder Tumor – unabhängig von der Herkunft - bestimmte Antigene präsentiert, an denen das Immunsystem angreifen kann (Srivastava, Old 1988).

Die Entdeckung, dass mit IL2 aktivierte Lymphozyten *in vitro* Tumorzellen angreifen (Grimm et al. 1982), führte in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts zu großen klinischen Studien, um die therapeutische Wirkung der Zytokine bei verschiedenen Krebsarten zu untersuchen. IFN- $\alpha$ , das bis dahin für seine Funktion in der Virusabwehr bekannt war, konnte eine gute Antitumor-Aktivität gegen Leukämien, Melanome und einige solide Tumoren beweisen. Rekombinantes IFN zeigte immunregulatorische, antiproliferative, apoptotische und antiangiogenetische Wirkungen (Wang et al. 2011). Im Jahre 1986 wurde IFN- $\alpha$ 2 zur Therapie der Haarzellleukämie zugelassen, später auch für weitere Malignome (Ferrantini et al. 2007).

In den frühen 90er Jahren wurden die ersten Tumorantigene gefunden, die eine T-Zell-Aktivität auslösen können (Boon et al. 1994). Dies eröffnete neue Wege in der Entwicklung von Tumorimmuntherapien, denn Tumorantigene unterschiedlichen Ursprungs können eine zelluläre und humorale Antwort in Krebspatienten auslösen. Epitope dieser Antigene können auf MHC-I präsentiert werden und so zytotoxische T-Zellen stimulieren, die direkt Tumorzellen angreifen. Andererseits können die Epitope durch Antigen-präsentierende Zellen auf MHC-II präsentiert und so durch CD4+-T-Zellen erkannt werden, die eine humorale Immunantwort auslösen können (Sahin et al. 1995).

Eine erste Generation von Peptid- und Proteinvakzinen konnte in einer Minderheit der Patienten mit fortgeschrittenem Krebs eine klinische Evidenz erbringen (Rosenberg et al. 2004). Erst mit der Entdeckung der Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*, PRR) und dem vertieften Verständnis des Zusammenspiels von angeborener und adaptiver Immunabwehr ließen sich vielversprechendere Strategien zur Vakzination entwickeln. Die Liganden einer wichtigen Klasse von PRR – den *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) – können zusammen mit einem Peptid-Vakzin eine starke Stimulation von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen auslösen (Speiser et al. 2005).

Auch andere Ansätze der Tumorimmuntherapie wurden in den letzten Jahrzehnten erprobt. Dazu gehören der Einsatz von Vakzinen mit oder ohne dendritische Zellen und der adoptive T-Zell-Transfer. Monoklonale Antikörper sind in der heutigen Krebstherapie nicht mehr wegzudenken und werden auch in anderen Bereichen der Medizin, zum Beispiel der Rheumatologie, erfolgreich eingesetzt (Ribatti 2014). Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von TLR-Liganden auf das Tumorwachstum; daher werden andere therapeutische Ansätze nur am Rande gestreift. Die Funktionsweise der TLR in der angeborenen Immunität wurde erst im Laufe der letzten beiden Jahrzehnte intensiv erforscht. Das Konzept der PRR ist dabei grundlegend für das Verständnis der Funktionsweise der angeborenen Immunität und wird im Folgenden genauer erläutert.

(Dieses Kapitel orientiert sich an einem Review von Kirkwood et al. 2012)

## 1.2. PATTERN RECOGNITION-REZEPTOREN

PRR sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems und unerlässlich für die Erkennung von Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen. Sie erkennen bestimmte molekulare Muster, die mit Pathogenen assoziiert sind und als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) bezeichnet werden. Diese sind charakterisiert als hochkonservierte Muster, die nicht im Wirtsorganismus vorkommen und für das Pathogen essenziell sind und so kaum mutieren (Ausubel 2005)

Somit unterliegen auch die PRR keiner somatischen Rekombination, wie beispielsweise der T-Zell-Rezeptor in der adaptiven Immunität (Janeway, C A Jr 1989). Beispiele für PAMP sind das Lipopolysaccharid (LPS) der Zellwand gramnegativer Bakterien, die unmethylierten CpG-Motive der bakteriellen DNA und doppelsträngige RNA viralen Ursprungs.

Ihre Wirkung entfalten die PRR einerseits über die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL6, oder IFN- $\alpha$  und antimikrobiellen Substanzen (Kawai, Akira 2008). Andererseits wird die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) angeregt. Erst wenn diese kostimulatorischen Moleküle ausreichend exprimiert werden, kann eine adäquate Reaktion des adaptiven Immunsystems erfolgen (Murphy et al. 2008).

Es existiert eine Reihe von PRR, die unterschiedliche Muster erkennen und in verschiedenen Zellorganellen sitzen. Die wichtigsten Klassen und Mitglieder werden im Folgenden vorgestellt. TLR befinden sich an Zellmembranen und erkennen Bestandteile von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen. RIG-I-like-Helikasen sind im Zytosol und reagieren auf RNA unterschiedlicher Länge, wie sie in RNA-Viren vorkommt. Da diese beiden Klassen für diese Arbeit von hoher Relevanz sind, werden sie unten detaillierter beschrieben (1.2.1 und 1.2.2).

Eine für die Immunabwehr gegen pathogene Pilze wichtige Klasse sind die C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR), zu denen unter anderem Dectin-1 und -2 zählen und die Bestandteile der Pilzwand wie  $\beta$ -Glucan reagieren. NOD-Like Rezeptoren (NLR) befinden sich im Zytosol und erkennen Bestandteile intrazellulärer Bakterien (Palm, Medzhitov 2009; Takeuchi, Akira 2010).

### 1.2.1. TOLL-LIKE-REZEPTOREN

*Toll*, ein Protein in *Drosophila melanogaster*, wurde bei Untersuchungen zur embryologischen Entwicklung der Fruchtfliege identifiziert. Später entdeckte man, dass es an der Wurmabwehr von *Drosophila* beteiligt war (Lemaitre et al. 1996). Bald darauf wurden homologe Proteine in Mensch und Maus gefunden und als *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) bezeichnet. Sie sind evolutionär hoch konserviert und vom Wurm *Caenorhabditis elegans* bis hin zum Menschen vorhanden (Janeway, Medzhitov 2002).

Alle TLR sind Typ-1-Transmembran-Proteine. Sie besitzen eine Leucin-reiche Ektodomäne am aminoterminalen Ende, die für die Erkennung der PAMP zuständig ist. Außerdem eine transmembrane Domäne und am carboxyterminalen Ende eine *Toll-interleukin-1-receptor*-homologe Domäne (TIR), die das *Downstream*-Signaling aktiviert (Akira, Takeda 2004; Bowie, O'Neill 2000).

Man unterscheidet zwischen TLR an der Plasmamembran der Zelle, die Protein-Lipid-Strukturen erkennen, und solche in den Endosomen. Letztere erkennen Nukleinsäuren, die die Zellen aufgenommen haben. Inzwischen sind zehn humane und 12 murine TLR bekannt. TLR finden sich vor allem auf Zellen des angeborenen Immunsystems, doch auch normales Gewebe und Tumorzellen können TLR exprimieren (Lester, Li 2013).

*Tabelle 1: Ausgewählte Toll-Like-Rezeptoren und ihre Liganden*

TLR	Ligand	Lokalisation	Adapter-Protein	Referenz
TLR3	virale dsRNA, poly(I:C)	Endosom	TRIF	(Alexopoulou et al. 2001)
TLR4	LPS:CD14	Plasmamembran, Endosom	TRIF, MyD88	(Poltorak et al. 1998)
TLR7	Imiquimod, Resiquimod (R848), ssRNA	Endosom	MyD88	(Hemmi et al. 2002; Jurk et al. 2002; Heil et al. 2004)

TLR8	Imiquimod, R848, ssRNA	Endosom, teilweise Plasmamembran	MyD88	(Heil et al. 2004; Jurk et al. 2002)
TLR9	CpG-ODN	Endosom	MyD88	(Hemmi et al. 2000)

TLR benutzen zwei verschiedene Signalwege. Alle TLR außer TLR3 signalisieren über das Adapterprotein MyD88. TLR3 und TLR4 haben hier insofern eine Sonderrolle, als dass sie exklusiv (TLR3) oder zusätzlich (TLR4) über das Protein TRIF signalisieren (Kawai, Akira 2010). TLR3 und TLR7/8 werden aufgrund ihrer Relevanz für diese Arbeit nun genauer beschrieben.

### TLR3

TLR3, das im Endosom lokalisiert ist, erkennt doppelsträngige RNA von virusinfizierten apoptotischen Zellen und kann *Cross-Priming* auslösen und somit die adaptive Immunität aktivieren (Schulz et al. 2005). TLR3 benutzt das Adapter-Protein TRIF um IRF3 und NFκB zu induzieren. Dies führt zur Produktion von IFN-β und proinflammatorischen Zytokinen (Kawai, Akira 2010).

### TLR7/8

TLR7/8 erkennt Infektion von Viren mit einzelsträngiger RNA, wie z.B. das Vesikuläre Stomatitis-Virus (Diebold et al. 2004). Synthetische Liganden sind die kleinen Imidazoquinolin-Verbindungen Imiquimod und R848 (R848) (Hemmi et al. 2002). Im Gegensatz zu TLR3 rekrutieren TLR7 und TLR9 das Protein MyD88, das den NFκB-Signalweg aktiviert und zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen in myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) und Makrophagen führt (Kawai, Akira 2010).

### TLR7 UND TLR9 IN PLASMAZYTOIDEN DENDRITISCHEN ZELLEN

Eine Ausnahme gilt hier in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs). Diese sind eine B220-positive Subgruppe der DC. Sie sind *in vivo* für einen Großteil der PAMP-induzierten IFN-Antwort verantwortlich (Siegal et al. 1999). In diesem Zelltyp bildet MyD88 einen

Komplex mit dem Transkriptionsfaktor IRF7. Dadurch führt die Aktivierung von TLR7 und TLR9 in pDCs zur Bildung von Typ-1-Interferonen (IFN) (Kawai, Akira 2010).

### 1.2.2. RIG-I-LIKE-HELICASES (RLH)

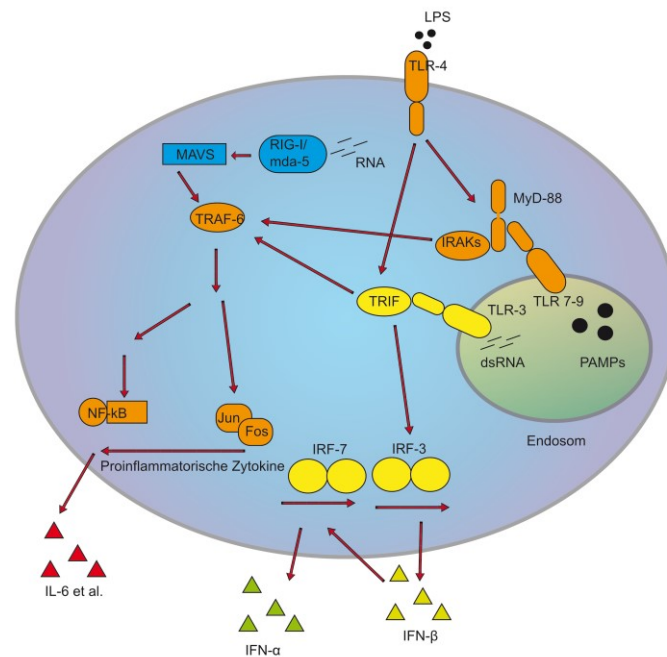
Die wichtigsten Mitglieder der RLH-Proteinfamilie sind RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation associated gene 5*). Beide sind in den meisten Gewebearten exprimiert und erkennen virale doppelsträngige Ribonukleinsäuren im Zytoplasma, die bei der Virus-Replikation entstehen (Yoneyama et al. 2004). Ihre Aktivierung führt über Mitglieder der IRF-Proteinfamilie hauptsächlich zur Produktion von Typ-1-IFN und der Expression von antiviralen Genen (Loo, Gale, JR 2011).

Der synthetische Ligand von RIG-I ist 5'-Triphosphat-RNA (Hornung et al. 2006). Es wurde berichtet, dass MDA5 einzel- und doppelsträngige virale RNA definierter Länge sowie längere Fragmente von poly(I:C) erkennt (Kato et al. 2008). Beide sind *in vivo* an der Erkennung unterschiedlicher Viren beteiligt (Kato et al. 2006).

RIG-I und MDA5 interagieren mit MAVS, das an der mitochondrialen Membran lokalisiert ist. Die Aktivierung dieser PRR führt über IRF3, IRF7 und NFκB zu einer Ausschüttung von Typ-I-IFN und – in geringerem Maß – auch von proinflammatorischen Zytokinen (Yoneyama et al. 2004).



### 1.2.3. ÜBERBLICK ÜBER DIE SIGNALWEGE



**Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Signalwege der Pattern-Recognition-Rezeptoren.**

TLR bezeichnet hier alle TLR außer TLR3 und TLR4, diese sind getrennt dargestellt. IL6 et al. meint neben IL6 auch andere proinflammatorische Zytokine. Modifiziert nach (Kumar et al. 2009)

### 1.2.4. WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PRR

Wie schon angedeutet, signalisieren die meisten PRR über ähnliche Signalwege, was auch zu unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen ihnen führen kann. Ein synergistischer Effekt kann beispielsweise bei zeitgleicher Stimulation mehrerer TLR auftreten. Dies wurde insbesondere für eine Kombination von Liganden für MyD88-abhängige und –unabhängige TLR gezeigt. Ein solcher synergistischer Effekt zeigte sich vor allem bei der IL12-Produktion von DC und scheint von Typ-I-IFN abhängig zu sein (Napolitani et al. 2005; Bagchi et al. 2007; Krummen et al. 2010).

Interessanterweise wurde erst kürzlich gezeigt, dass diese Kombination zweier MyD88-abhängiger und –unabhängiger TLR-Liganden (R848 + LPS bzw. poly(I:C) + LPS) zwar die Zytokinausschüttung erhöht, das Tumorwachstum in einem CT26-Maus-Modell im Vergleich zu einer Monotherapie aber nicht verbessern kann (Stier et al. 2013b).

Bei den meisten Untersuchungen zu Wechselwirkungen verschiedener PRR wurden die Liganden zeitgleich gegeben. Bei der sequentiellen, also zeitlich um sechs bis 24 Stunden versetzten Stimulation verschiedener Rezeptoren ist vor allem eine Tachyphylaxie zwischen verschiedenen MyD88-abhängigen TLR beschrieben worden (1.2.6). Zur zeitlich versetzten Stimulation von TLR und *RIG-like Receptors* (RLR) gibt es weniger Literatur. Hier ist vor allem eine Sensitivierung beschrieben, die im Folgenden genauer dargelegt wird.

#### 1.2.5. SENSITIVIERUNG

Was oben für eine simultane *Stimulation* beschrieben wurde, gilt auch für eine sequentielle: Eine Mischung von MyD88-abhängigen und –unabhängigen TLR-Agonisten führt zu einer Sensitivierung. Alle MyD88-abhängigen TLR sind in Makrophagen nach vorheriger Sensitivierung mit poly(I:C) empfindlicher gegenüber einer nachfolgenden *Stimulation* anderer TLR. Umgekehrt kann die IFN- $\beta$ -Sekretion durch Aktivierung von TLR3 oder TLR4 durch einen vorherigen TLR9-Stimulus deutlich erhöht werden (Bagchi et al. 2007; Broad et al. 2007).

Auch kann die Verabreichung von poly(I:C) an Mäuse, als Modell einer viralen Infektion, die Sekretion proinflammatorischer Zytokine als Antwort auf die Stimulation der PRR NOD1 und NOD2 verstärken. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass die Letalität in Folge einer bakteriellen Infektion mit *E. coli* nach vorheriger poly(I:C)-Gabe erhöht ist. Das bedeutet, dass durch poly(I:C) auch schädliche Effekte im infizierten Wirt in Gang gesetzt werden. Dieser Mechanismus wird über Typ-1-IFN vermittelt und benötigt außerdem Adapterproteine von TLR3 (TRIF) und MDA5 (IPS1) (Kim et al. 2011).

Nach einer VSV-Infektion oder einer poly(I:C)-Injektion reagieren Mäuse mit einer erhöhten Zytokinsekretion auf LPS. Dieser Effekt ist von IFN- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -abhängig und auch durch eine Vorbehandlung der Tiere mit diesen IFN auslösbar (Nansen, Randrup Thomsen 2001).

#### 1.2.6. TACHYPHYLAXIE

Wenn die gleichen Signalwege allerdings repetitiv, also mehrmals mit ausreichendem zeitlichem Abstand, stimuliert werden, treten Tachyphylaxie-Effekte auf. Die wiederholte, sequentielle Gabe von MyD88-abhängigen TLR-Liganden – direkt auf kultivierten

Immunzellen oder *in vivo* - führt zur Modulation der Zytokinsekretion, in diesem Fall zu einer reduzierten oder ausbleibenden Antwort. Dieses Phänomen wird als TLR-Toleranz bezeichnet. Zuerst entdeckt wurde sie am TLR4-Agonisten Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin), sie ist deshalb auch als Endotoxintoleranz bekannt. Monozyten, die von septischen Patienten isoliert wurden, zeigten eine Hyposensibilität gegenüber Endotoxin (Wysocka et al. 2001; Wilson et al. 1997). Die Toleranz kann auch zwischen verschiedenen TLR-Agonisten auftreten, und zwar zwischen vielen Liganden MyD88-abhängiger TLR, was als *Cross-Tolerance* bezeichnet wird (Bagchi et al. 2007; Broad et al. 2007; Sato et al. 2002).

Die Toleranz, die so durch repetitive Gaben des TLR7-Agonisten R848 entsteht, kann bis zu 120 Stunden anhalten. Dies wurde in einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe in einem murinen *in vivo*-Modell nachgewiesen. Die Toleranz zeigt sich durch einen deutlichen Rückgang der Serumwerte von Typ-I-IFN sowie proinflammatorischen Zytokinen (IL6 und IL12) ab der zweiten Injektion. Ähnliche Effekte treten auf, wenn man kultivierte, primäre Immunzellen mit TLR-Agonisten stimuliert. Weiter konnte gezeigt werden, dass diese Tachyphylaxie einen stark negativen Effekt auf eine Tumorthherapie mit R848 hat und so deren Effektivität stark limitiert (Bourquin et al. 2011).

## 1.3. TUMOR-IMMUNTHERAPIE MIT PRR-AGONISTEN

### 1.3.1. DAS PRINZIP DER TUMOR-IMMUNTHERAPIE MIT PRR-AGONISTEN

Da PRR-Agonisten eine starke Immunantwort auslösen können, wurde ihre Tauglichkeit für die Tumorthherapie schon früh getestet. Dabei können PRR-Agonisten als Monotherapie, als Kombination mit Radiochemotherapie, als Adjuvans einer Vakzinierung mit Tumor-Antigenen, als Adjuvans eines DC-Vakzins oder als Adjuvans bei der adoptiven T-Zelltherapie eingesetzt werden (Kirkwood et al. 2012). Diese Arbeit wird sich auf die Verwendung als Monotherapie konzentrieren. Bei allen diesen Therapieformen geht es aber darum, eine gezielte Immunabwehr gegen Tumorantigene zu induzieren.

Die Wirkung von PRR-Agonisten setzt sich dabei aus mehreren Komponenten zusammen. Zunächst erfolgt die Aktivierung von DC, die dann zytotoxische T-Zellen gegen Tumor-Antigene sensitivieren. Außerdem werden Natürliche Killerzellen (NK) aktiviert. Schlussendlich kann die immunologischen Toleranz durchbrochen werden und die Apoptose in Tumorzellen induziert werden (Paulos et al. 2007).

Dabei sind Zytokine wie IFN- $\alpha$  und IL12p70 von großer Bedeutung (Germano et al. 2008). Durch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch Zytokinsekretion und Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 kann die Toleranz gegen tumoreigene Antigene aufgehoben werden, die der Tumor durch verschiedene Mechanismen herbeiführen kann. Dazu zählen zum Beispiel die Reduzierung der Oberflächenantigene oder die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL10 (Rakoff-Nahoum, Medzhitov 2009).

Typ-I-IFN, die auf TLR3/7/8-Stimulation hin gebildet werden, sind für verschiedene Aspekte des adaptiven Immunsystems essenziell. Dazu zählen die Vereinfachung der Kreuz-Präsentation, die Induktion von T-Gedächtnis-Zellen, die Verhinderung der T-Zell-Apoptose, die DC-Reifung und die Aktivierung von NK-Zellen (Iwasaki, Medzhitov 2004).

Auch die proinflammatorischen Zytokine IL6 und IL12 werden durch die TLR-Stimulation gebildet. Dabei führt IL6 zu einer Antigen-spezifischen T-Zellantwort durch Suppression von regulatorischen T-Zellen. Regulatorische T-Zellen erhalten die periphere T-Zell-

Toleranz, ihr Fehlen führt zu schweren Autoimmunerkrankungen. Allerdings können sie in der Tumor-Mikroumgebung für die Unterdrückung einer Immunantwort gegen den Tumor sorgen (Pasare, Medzhitov 2003). IL12 führt zu einer Verschiebung hin zu einer Antwort von Typ-1-T-Helferzellen (Th1-Antwort), bei der über eine verstärkte Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen eine spezifische T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen ausgelöst werden kann (Trinchieri 2003).

### 1.3.2. R848 UND POLY(I:C) ALS ADJUVANTIEN IN DER TUMOR-IMMUNOTHERAPIE

#### **R848**

R848 gehört zur Gruppe der Imidazoquinoline. Deren am besten untersuchter Vertreter ist Imiquimod, ein Nukleosidanalogen. Die meisten der frühen Erkenntnisse über die Wirkungsweise von TLR7/8-Agonisten wurden mit Imiquimod gewonnen. Es ist vor allem ein TLR7-Agonist, auf TLR8 wirkt es deutlich schwächer (Schön, Schön 2008). Imiquimod ist zur topischen Anwendung beim Melanom zugelassen und konnte dort eine moderate Wirksamkeit zeigen (Ellis et al. 2012).

R848 bindet an die gleichen Rezeptoren wie Imiquimod, löst aber im Vergleich dazu eine stärkere Zytokinausschüttung, Makrophagen-Aktivierung und Induktion der zellulären Immunität aus (Schön, Schön 2008). Im Sinne der biologischen Wirkung könnte es deshalb das überlegene Adjuvans in der Tumorummuntherapie sein. Daher wurde es in dieser Arbeit verwendet.

Die Wirkungsweise der Imidazoquinoline in der Tumorummuntherapie beruht vor allem auf der NF $\kappa$ B-vermittelten Induktion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL2, -6, -8, -12, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\alpha$  (nur in pDCs) und Chemokinen wie CCL-2, -3 und -4, welche dann eine gezielte Th1-Anti-Tumor-Antwort des adaptiven Immunsystems bewirken (Brugnolo et al. 2003). Auch kann in einer NF $\kappa$ B-unabhängigen Weise IFN- $\gamma$  gebildet werden, was zur Migration von dendritischen Zellen und zytotoxischen T-Zellen beitragen kann und eine Th2-Antwort unterdrückt (Palamara et al. 2004). Da dendritische Zellen bereits mit sehr viel geringeren Konzentrationen dieser Imidazoquinoline Zytokine bilden als andere Zelltypen, sind sie die wichtigsten Effektorzellen (Gibson et al. 2002; Reiter et al. 1994). Abgesehen von der Induktion der adaptiven Immunität wurde für Imiquimod auch eine direkte Wirkung auf

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) beschrieben (Navi, Huntley 2004). pDCs können unmittelbar durch IFN oder mittelbar über PAMP wie R848 aktiviert werden. Sie können *in vitro* Melanomzellen direkt angreifen und lysieren (Kalb et al. 2012).

In der Tat wurde ein starker Rückgang von etablierten Tumoren nach Gabe von PRR-Agonisten in Mäusen und Menschen beobachtet (Garay et al. 2007). TLR7- und TLR8-Agonisten sind in der Erprobung für die Behandlung von Hautkrebs und chronischer lymphatischer Leukämie in Menschen (Scheel et al. 2006). Imiquimod hat sich mittlerweile zur topischen Therapie kleiner Basalzellkarzinome bewähren können (Eigentler et al. 2007). Systemische Therapieverfahren wurden eine Zeit lang aufgrund der bestehenden Limitierungen kaum mehr klinisch getestet, in letzter Zeit gab es aber wieder vermehrt klinische Studien (1.3.3).

Allerdings sind TLR7 und TLR8 in Lungenkrebspatienten überexprimiert (Samara et al. 2012) und können zur Entzündung, zum Tumorwachstum und zur Metastasenbildung beitragen. Auch konnte die Gabe von TLR7/8-Agonisten die Resistenz von Lungenkrebszellen gegen einige Chemotherapeutika deutlich erhöhen. Außerdem kam es zur vermehrten Expression von VEGFR2, welches zur Angiogenese beiträgt (Cherfils-Vicini et al. 2010).

### **POLY(I:C)**

Poly(I:C) (*Polyinosinic:polycytidylic acid*) ist eine synthetische doppelsträngige RNA. Der eine Strang besteht aus einer Kette von Inosinnukleotiden, der Gegenstrang aus Cytidinnukleotiden. Ihre immunstimulatorische Wirkung wurde bereits in den frühen 70er Jahren entdeckt, allerdings wusste man damals noch nichts über die zugrundeliegenden Mechanismen. Poly(I:C) wird über TLR3, aber auch über die zytoplasmatischen RLH erkannt. Weder die genaue Rolle der unterschiedlichen Rezeptoren noch der Mechanismus, mit dem Poly(I:C) in das Zytoplasma der Zellen eindringt, ist bislang abschließend geklärt. Sowohl RIG-I (Yoneyama et al. 2004) als auch MDA5 (Gitlin et al. 2006) wurden als essenziell für die Erkennung doppelsträngiger RNA beschrieben.

Die Wirkung von Poly(I:C) beruht auf ähnlichen Mechanismen wie die Wirkung von R848: Bildung von inflammatorischen Zytokinen, Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen, DC-Reifung und Einleitung der Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen. Hohe Dosen

von poly(I:C) können außerdem die Apoptose auslösen und so direkt Tumorzellen beseitigen (Cheng, Xu 2010; Zhao et al. 2012). Poly(I:C) induziert *Cross-Priming* in Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) (Schulz et al. 2005) und kann somit eine Reaktion von T-Killerzellen gegen einen Tumor auslösen. Beim *Cross-Priming* werden extrazelluläre Antigene auf MHC-I präsentiert. Zytotoxische T-Zellen können sich daraufhin gegen Tumorzellen wenden.

In mehreren Tumorentitäten konnte eine Wirksamkeit von Poly(I:C) nachgewiesen werden (Cheng, Xu 2010). Der Anti-Tumor-Effekt kann durch eine Kombination mit Chemotherapeutika gesteigert werden (Taura et al. 2010). Die Anwendung von Poly(I:C) im Menschen führt jedoch zu erhöhten Transaminasenspiegeln im Serum, Fieber und veränderten Gerinnungswerten (Freeman et al. 1977; Krown et al. 1985). Diese Nebenwirkungen sind letztendlich limitierend für den effektiven klinischen Einsatz.

### 1.3.3. AKTUELLE ENTWICKLUNGEN

In den letzten Jahren wurden einige vielversprechende Studien zur Tumorimmuntherapie mit PRR-Liganden durchgeführt oder begonnen. In vielen dieser Studien werden die PRR-Liganden als Adjuvantien oder *Booster* eingesetzt, in einigen aber auch als alleinige Immuntherapie.

TMX-101, eine Lösung des TLR7-Liganden Imiquimod wurde als einzige Therapie bei Patienten mit papillärem Blasenkrebs als intravesikuläre Verabreichung getestet (Arends, Tom J H et al. 2015). Der Einsatz erfolgte wöchentlich. Bei fast 90 % der Patienten traten Nebenwirkungen auf, die aber überwiegend mild waren. Ein klinisches Ansprechen konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Mehrere Studien wurden mit dem TLR9-Agonisten IMO-2055 durchgeführt, bei denen sich generell eine gute Verträglichkeit zeigte. IMO-2055 wurde bei Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom in Kombination mit Erlotinib/Bevacizumab (Smith et al. 2014) bzw. bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in Kombination mit FOLFIRI (Folsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan) und Cetuximab (Chan et al. 2015) als wöchentliche subkutane Injektion verabreicht. 6-15 % zeigten ein partielles Ansprechen.

Auch andere TLR9-Agonisten zeigten generell eine gute Verträglichkeit und teilweises Ansprechen (Schmoll et al. 2014), (Ursu et al. 2015).

Mit Hiltonol, eine spezielle Verabreichungsform von Poly(I:C), welches durch Carboxymethylcellulose und Poly-L-Lysin stabilisiert wird, wurden in letzter Zeit eine Reihe von Studien begonnen. Dabei wird Hiltonol als intramuskuläre alleinige Therapie bei soliden Tumoren eingesetzt und bei einer Reihe von weiteren Tumorentitäten in Kombination mit Peptidvakzinen und/oder therapeutischen Antikörpern (Iribarren et al. 2015).

In einer Studie mit 47 Kindern mit Hirntumoren konnte Hiltonol als alleinige Intervention erfolgreich eingesetzt werden, es zeigten sich keine so gravierenden unerwünschten Wirkungen, dass die Therapie abgebrochen werden musste. Drei von Zwölf Patienten mit hochgradigen Gliomen und zwei von vier mit niedriggradigen Gliomen zeigten ein objektives Ansprechen. In einer anschließenden Phase-II-Studie zeigten 5 von 10 Patienten ein partielles Ansprechen (Hartman, Lisa L R et al. 2014).

Diese Ergebnisse zeigen, dass PRR-Adjuvantien durchaus Potential in der Therapie bestimmter Tumorentitäten haben, aber die optimale Verabreichungsform noch nicht gefunden ist.



## 1.4. FRAGESTELLUNG

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden bei Experimenten mit PRR-Liganden zwei interessante Beobachtungen gemacht:

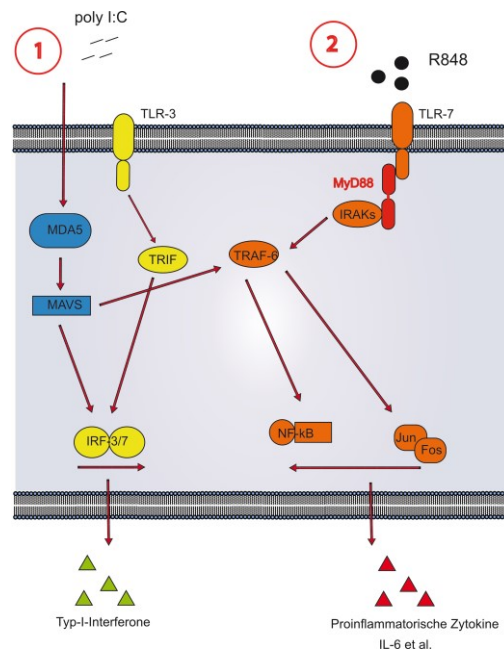
Eine abwechselnde Stimulation von MyD88-abhängigen und –unabhängigen TLR führt in vielen Immunzellen zu keiner Toleranz, sondern zu einer Sensitivierung auf den zweiten Stimulus. Insbesondere gilt dies für eine Präkonditionierung mit poly(I:C) und der daraufhin folgenden Stimulation mit R848. Dieser Effekt wurde bereits mehrfach beschrieben (siehe 1.2.4)

Darüber hinaus führt die Präkonditionierung von Immunzellen mit Poly(I:C) zu einem bisher noch nicht beschriebenen Effekt, nämlich zur Blockade der Zytokinantwort auf einzelsträngige RNA. Bei einer 24 Stunden nach der initialen poly(I:C)-Gabe erfolgenden Stimulation von RIG-I mit dem Liganden ppp-RNA kommt es zu keiner IFN-Antwort mehr. Durch die Stimulation mit Poly(I:C) kommt es also zu einer Reprogrammierung der Immunzellen, die ihre Reaktion auf weitere PAMP modifiziert. Diese beiden Effekte werden in Abbildung 2 zusammengefasst dargestellt.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist die Zielsetzung dieser Arbeit, die Reprogrammierung der Immunzellen in Reaktion auf Poly(I:C) erstmals genauer und umfassend zu untersuchen. Dazu muss spezifiziert werden, in welchen Zelltypen sie vorkommen, und es sind Versuche zur Übertragbarkeit *in vivo* durchzuführen. Weiterhin gilt es, die dahinter liegenden molekularen Mechanismen aufzudecken und zu ergründen, welchen physiologischen Hintergrund dieser Effekt haben könnte. Poly(I:C) simuliert nach gängiger Auffassung eine Virusinfektion (Alexopoulou et al. 2001; Freeman et al. 1977), weswegen die Reprogrammierung Auswirkungen auf zeitlich nachfolgende Infektionen hat und in bestimmten Szenarien von sequentiellen viralen und bakteriellen Infektionen die Immunantwort kontrollieren und spezifizieren kann.

Auch für die Tumorummuntherapie ist die Reprogrammierung relevant. Insbesondere der *Priming*-Effekt könnte ein Lösung für ein Problem sein, das in der experimentellen Tumorthherapie mit PRR-Agonisten bislang limitierend war: R848 kann zwar sehr schnell sehr hohe Zytokinantworten auslösen, die allerdings nicht lange anhalten. Eine wiederholte Gabe führt allerdings zu einem toleranten Status, weitere R848-Dosen können dann keine

ausreichenden Zytokinantworten mehr bewirken. An einem CT26-Tumormodell der Maus wurde in der Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass dies die Tumorthherapie negativ beeinflusst (Bourquin et al. 2011). Daher wird in dieser Arbeit eine Reihe von Experimenten beschrieben, die mithilfe einer sequentiellen *Stimulation* von PRR diese Toleranz zu umgehen versuchen.



**Abbildung 2: Vereinfachtes Prinzip der sequentiellen Stimulation.**  
Zuerst wird mit poly(I:C) (1) stimuliert, später mit R848 (2).

## 2. MATERIAL UND METHODEN



## 2.1. MATERIALIEN

### 2.1.1. TECHNISCHE AUSSTATTUNG

BD FACS Canto II	BD Biosciences, San Diego, USA
Mithras LB940 Plattenlesegerät	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
LightCycler 480	Roche, Basel, Schweiz
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

### 2.1.2. CHEMIKALIEN

Aqua ad iniectabilia	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cycloheximid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Deutschland
FACSFlow, FACSSafe	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 I.E./5 ml	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
<i>In vivo</i> jetPEI	Polyplus transfection, New York, USA
Isofluran (Forene®)	Abbott, Zug, Schweiz
Isopropanol (70 Vol%)	Apotheke Innenstadt, LMU München
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, Carlsbad, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

PharmLyse Lysereagenz	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Poly(A:U)	Invivogen, San Diego, USA
Poly(I:C)-LMW	Invivogen, San Diego, USA
R848	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2 N)	Apotheke Innenstadt, LMU München
TMB Substrate Reagent Set	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Trypan-Blau	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA

### 2.1.3. MATERIALIEN

EIA/RIA-Platten (96 Well)	Costar, Corning, USA
Zellkulturflaschen (CellStar)	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
40 µm Filter (BD Falcon)	BD Biosciences, San Diego, USA
LS MACS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

### 2.1.4. PUFFER

#### **ELISA COATING BUFFER 1**

0.2 M Natriumphosphat

in aqua dest.; pH 6.5

#### **ELISA ASSAY DILUENT**

10 % FCS

#### **ELISA COATING BUFFER 2**

0.1 mM Natriumkarbonat

in aqua dest.; pH 9.5

#### **ELISA WASH BUFFER**

0.05% Tween 20

in PBS; pH 7.0

in PBS

#### **MACS-PUFFER**

ERYLYSE-PUFFER

10 % FCS + 10 mM EDTA

10 % Pharmlyse in PBS

In PBS

### 2.1.5. KITS

#### **CYTOKINE ELISA SETS**

Murines IL6

BD Biosciences, San Diego, USA

Murines IL12p70

BD Biosciences, San Diego, USA

#### **RNA KITS**

MEGAscript® T7 Kit

Ambion, Austin, USA

RevertAid™ H Minus First Strand

Fermentas, Burlington, Kanada

cDNA Synthesis Kit

Invitrogen, Carlsbad, USA

### 2.1.6. ANTIKÖRPER

#### **DETEKTION VON MURINEM IFN- $\alpha$**

Capture-AK: Anti-IFN- $\alpha$  (RMMA-1)

PBL, New Brunswick, USA

Detection-AK: Anti-IFN- $\alpha$

PBL, New Brunswick, USA

(polyklonal, Hase Anti-Maus)

IgG-HRP

Santa Cruz Biotechnology, USA

(Ziege Anti-Hase)

#### **NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER**

Anti-IFN- $\alpha$  (Hase pAb)

PBL IFN Source, Piscataway, USA

Anti-IFN- $\beta$  (Hase pAb)

PBL IFN Source, Piscataway, USA

## FACS-ANTIKÖRPER

Anti-CD11c APC BD Biosciences, USA

Anti-CD80	PE	Biolegend, USA
-----------	----	----------------

Anti-CD86      FITC      BD Biosciences, USA

### 2.1.7. MEDIEN

## DC- UND KNOCHENMARKZELL-MEDIUM

500 ml RPMI 1640 (PAA, Pasching, A)	1% PenStrep (PAA, Pasching, A)
-------------------------------------	--------------------------------

10 % FCS (GibcoBRL, Karlsruhe, D)                      1% L-Glutamin (PAA, Pasching,  
A)

## PDC-MEDIUM

500 ml RPMI mit stabilem Glutamin (PAA, Pasching, A) 1 % PenStrep (PAA, Pasching, A)

10 % FCS (GibcoBRL, Karlsruhe, D) 1 % MEM-NEAA (Sigma-A., D)

1 % Natrium-Pyruvat



## 2.2. METHODEN

### 2.2.1. ZELLKULTUR

Alle Zellentypen wurden in einem Brutschrank in 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert. Alle Arbeiten an den Zellen wurden unter einer sterilen, laminaren Werkbank durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Trypanblau-Ausschlusstest verwendet. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl der Zellen bestimmt, die den Farbstoff ausschlossen. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen im Mikroskop dunkelblau.

Berechnung: Zellzahl/ml = Zahl in einer Kammer \* Verdünnungsfaktor \* 10<sup>4</sup>.

#### **GENERIERUNG VON MURINEN MYELOIDEN DENDRITISCHEN ZELLEN (MDCs)**

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Femur und Tibia wurden entnommen und das Knochenmark mit einer Kanüle mit PBS ausgespült. Die entstehende Suspension wurde über ein 40-µM-Sieb passiert und anschließend abzentrifugiert (400x g, 7 min, 4 °C). 1 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer wurde für 3 min auf das resuspendierte *Pellet* angewendet. Anschließend wurde noch einmal mit gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert und die Zellen im Medium gelöst.

Anschließend wurden bis zu 2\*10<sup>7</sup> Knochenmarkszellen in eine Zellkulturflasche mit 20 ml DC-Medium eingesetzt. Es wurde 20 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL4 zugegeben und die Zellen wurden für ca. fünf Tage im Brutschrank inkubiert.

#### **GENERIERUNG VON MURINEN PLASMAZYTOIDEN DENDRITISCHEN ZELLEN (PDCs)**

Das Knochenmark wurde wie unter 2.2.7 beschrieben entnommen. Anschließend wurden bis zu 4\*10<sup>7</sup> Knochenmarkszellen in eine Zellkulturflasche mit 20 ml pDC-Medium eingesetzt. 0,000375 % β-Mercaptoethanol und 20 ng/ml h-FLT3L wurden hinzugegeben und die Zellen für ca. acht Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die B220+-Zellen mittels MACS (2.2.2) isoliert.

## J774

Die Zellen der murinen J774-Makrophagen-Zelllinie wurden in DMEM-Medium (s.o.) kultiviert.

### 2.2.2. MAGNETIC CELL SEPERATION (MACS)

Zur Isolierung von pDCs aus murinen Knochenmarkszellen oder CD11c<sup>+</sup>-DC aus Milzzellen wurde die Methode der magnetischen Zellseparation (MACS) angewendet (Miltenyi et al. 1990). Es wurden Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) nach dem entsprechenden Hersteller-Protokoll verwendet.

### 2.2.3. FLOW CYTOMETRY

Es wurden 0,5 µl der Fluoreszenz-markierten Antikörper für 30 min bei 4 °C in 50 µl PBS mit den zu untersuchenden Zellen inkubiert. Anschließend wurden sie gewaschen und bei 400x g, 7 min 4 °C abzentrifugiert. Dann wurden die Proben im FACS Canto II mit der Software FACSDiva (beides BD, San Diego, USA) analysiert und mit FlowJo (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) ausgewertet.

### 2.2.4. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Zytokinkonzentrationen wurden mithilfe des Sandwich-ELISA detektiert. Der IL6- und der IL12p70-ELISA wurde nach dem Herstellerprotokoll (BD Opteia) durchgeführt.

Der IFN- $\alpha$ -ELISA wurde wie folgt durchgeführt: Eine 96-Well-Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit dem *Capture*-Antikörper (1 µg/ml) im *ELISA Coating Buffer 2* inkubiert, anschließend fünfmal mit *ELISA Wash Buffer* gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch drei Stunden Inkubation mit *ELISA Assay Diluent* bei Raumtemperatur geblockt. Die Proben und das Standard-Protein wurden für eine weitere Nacht bei 4 °C auf die Platte geladen. Nach erneutem zehnmalem Waschen wurde die Platte für drei Stunden bei Raumtemperatur mit dem *Detection*-Antikörper (625 ng/ml) in *Assay Diluent* und anschließend für ebenfalls drei Stunden mit dem *Horseradish-Peroxidase*-gekoppelte Antikörper (*IgG-HRP*) (15 µg/ml) beladen. Die Entwicklung erfolgte wie in den Herstellerprotokollen der BD Opteia-Kits.

## 2.2.5. QUANTITATIVE REAL-TIME-POLYMERASEKETTENREAKTION (QRT-PCR)

Zur relativen Quantifizierung von *messenger* RNA in den Tumorzellen wurde Real-time-Polymerase Chain Reactions mit dem LightCycler® 480 von Roche durchgeführt.

### RNA-ISOLATION

Die RNA-Isolation wurde mit TRIzol Reagent von Invitrogen laut dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurde eine Menge von 1 ml Trizol für ca.  $1\text{-}5 \cdot 10^6$  primäre Zellen verwendet. Die isolierte RNA wurde in H<sub>2</sub>O aufgelöst und mithilfe eines Photometers wurde die Konzentration bestimmt.

### CDNA-SYNTHESE

Mit Hilfe des RevertAid™ H Minus First Strand Synthesis Kit (Fermentas) wurde die RNA der Zellen in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben. Verwendet wurde eine Ausgangskonzentration von 1 µg RNA. Die Reverse Transkriptase synthetisiert die komplementäre DNA in einer einstündigen Reaktion bei 42 °C. Nach Deaktivierung des Enzyms bei 80 °C kann die cDNA mit Wasser verdünnt und für die RT-PCR verwendet werden.

### REAL-TIME-PCR

In einer LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 wurde jeweils ein zweifacher 10-µl-Ansatz aus folgenden Komponenten angesetzt:

*Tabelle 2: Komponenten der cDNA-Synthese*

1,5 µl	H <sub>2</sub> O, PCR-grade
0,2 µl	Primer (jeweils <i>forward</i> bzw. <i>reverse</i> )
5 µl	LightCycler®480 Probes Master
0,1 µl	Sonde (Roche)
5 µl	cDNA-Probe

Im LightCycler erfolgte die Inkubation bei 95 °C, die Amplifikation bei 60 °C und das Herunterkühlen auf 40 °C. Insgesamt wurden 50 Zyklen gefahren.

Die Quantifizierung der Ziel-mRNA erfolgte stets relativ zu einem *House-Keeping-Gen* (HPRT).

## PRIMERSEQUENZEN

**Tabelle 3: Verwendete Primersequenzen.**

In der Spalte „Sonde“ ist die für die qRT-PCR verwendete Sonde aus der Universal ProbeLibrary von Roche aufgeführt.

mRNA	Forward primer	Reverse primer	Sonde
IFN- $\beta$	5'-CAC AGC CCT CTC CAT CAA CTA-3'	5'-CAT TTC CGA ATG TTC GTC CT-3'	78
IRF7	5'-CTT CAG CAC TTT CTT CCG AGA-3'	5'-TGT AGT GTG GTG ACC CTT GC-3'	25
PKR	5'-GTT GTT GGG AGG GAG TTG AC-3'	5'-AGA GGC ACC GGG TTT TGT AT-3'	99
RIG-I	5'-GAC CCC ACC TAC ATC CTC AG-3'	5'-GGC CCT TGT TGT TCT TCT CA-3'	72
TLR7	5'-TGA TCC TGG CCT ATC TCT GAC-3'	5'-CGT GTC CAC ATC GAA AAC A-3'	25
HPRT	5'-TCC TCC TCA GAC CGC TTT T-3'	5'-CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC-3'	69

### 2.2.6. STIMULATION VON RIG-I MIT PPP-RNA

Die immunstimulatorische ppp-RNA 2.2s hat folgende Sequenz: 5'-GGCAUGCGACCUCUGUUUGA-3'. Die Synthese wurde mit dem MEGAscript-Kit auf Basis eines DNA-Templates (5'-TCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGTCGTA-3') durchgeführt (Hornung et al. 2006).

Für die Stimulation wurden 200 ng/ml RNA in Optimum gelöst. In einem getrennten Reaktionsgefäß wurden 2,5  $\mu$ l Lipofectamine RNAiMAX ebenfalls in Optimum gelöst. Nach 5 min wurden der Inhalt beider Gefäße vereinigt und 10 min bei RT stehen gelassen, damit sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. In einer 96-Well-Platte wurden 50  $\mu$ l der so gemischten Transfektionslösung mit 150  $\mu$ l DC-Medium vermischt.

## IN VIVO-TRANSFEKTION

*In vivo*-Transfektionen mit ppp-RNA wurden mit *in vivo* jetPEI der Firma Polyplus transfections nach Herstellerangaben durchgeführt. 25  $\mu$ g ppp-RNA + 3  $\mu$ l jetPEI wurden in

100 µl 5% Glukose gelöst und der Maus unter Narkose i.v. injiziert. Das entspricht einem Stickstoff/Phosphor-Ratio (N/P-Ratio) von 6.

#### 2.2.7. TIEREXPERIMENTELLE METHODEN

Die Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) des Klinikums der Universität München, Innenstadt, gehalten. Für die Experimente wurden weibliche Mäuse der Inzuchtlinien BALB/c oder C57BL/6 verwendet, die von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen wurden.

MDA5-Knockout-C57BL/6-Mäuse werden in einer Publikation der Gruppe um Gitlin beschrieben (Gitlin et al. 2006).

PKR-Knockout-Mäuse wurden von Zoe Weible (PEI, Langen) bezogen.

TRIF-Knockout-Mäuse stammten von Hans-Joachim Anders (LMU, München).

Vor allen Eingriffen, außer der subkutanen und intraperitonealen Injektion, wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt. Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Stelle der Regierung von Oberbayern genehmigt. Sämtliche angewandte Injektionen wurden mit Kanülen des Kalibers 27G (0,36 mm) durchgeführt.

#### **BLUTENTNAHME**

Das Blut wurde retroorbital mit einer Glaskapillare in ein Eppendorfgefäß mit etwas Heparin entnommen. Für die Bestimmung der Serum-Zytokin-Konzentration wurde das Vollblut für 8 min bei 6000x g abzentrifugiert. Das Serum wurde verdünnt für den ELISA verwendet.

#### **SPLENOZYTEN-ISOLATION**

Die Mäuse wurden nach Anästhesie durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Diese wurden mit PBS durch ein 40-µm-Sieb gedrückt, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Anschließend wurde abzentrifugiert (400x g, 7 min, 4 °C) und 3 min mit 2 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer behandelt.

#### **ISOLIERUNG VON KNOCHENMARK**

Siehe 2.2.1

## SUBKUTANES CT26-TUMORMODELL

Für die Generierung von Tumoren wurden BALB/c-Mäusen jeweils  $2 \times 10^5$  CT26-Zellen (in 200  $\mu$ l PBS) s. c. in die rechte Flanke injiziert. Der Allgemeinzustand der Tiere und das Tumorwachstum wurden regelmäßig überwacht.

Die Größe des Tumors in  $\text{mm}^2$  wurde als Produkt des größten Querdurchmessers mit dem größten Längsdurchmesser definiert. Bei Versuchsende wurden die Tiere getötet und die Organe und Gewebe zur weiteren Untersuchung entnommen.

### 2.2.8. STATISTISCHE METHODEN

Die statistische Auswertung wurde mit der Software *GraphPad Prism 5.02* vorgenommen. Sofern nicht anders angegeben wurde bei dem Vergleich zweier Gruppen ein ungepaarter t-Test mit zweiseitigem p-Wert verwendet (*unpaired t test with two-tailed p value*).

Signifikanzniveaus:

\*\*\*  $p < 0,001$

\*\*  $p < 0,01$

\*  $p < 0,05$

### 3. ERGEBNISSE





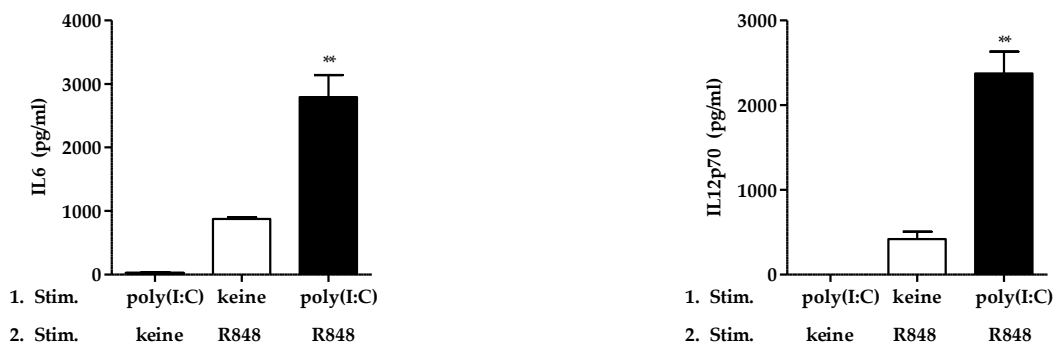
### 3.1. GRUNDLAGEN DER SEQUENTIELLEN STIMULATION VON PRR

#### 3.1.1. PRÄKONDITIONIERUNG MIT POLY(I:C) FÜHRT ZU EINER VERSTÄRKTEN ANTWORT AUF R848: *PRIMING* EFFEKT

Um zu untersuchen, in welchem Maße und für welche Zytokine eine Präkonditionierung mit poly(I:C) die auf eine nachfolgende R848-Stimulation ausgelöste Zytokinsekretion in murinem Knochenmark beeinflusst, wurden zunächst isolierte Knochenmarkszellen entweder unbehandelt gelassen oder 24 Stunden mit poly(I:C) inkubiert. Nach diesen 24 Stunden wurde das Medium abgewaschen, beide Gruppen wurden mit R848 restimuliert. Weitere 24 Stunden später wurde die Auswirkung auf die Zytokinsekretion mittels ELISA aus dem Überstand gemessen. Dieses Schema, das auch in vielen weiteren Versuchen dieser Arbeit verwendet wurde, wird hier exemplarisch in Abbildung 3 dargestellt.



*Abbildung 3: Allgemeines Prinzip der sequentiellen Stimulation von Pattern-Recognition-Rezeptoren.*

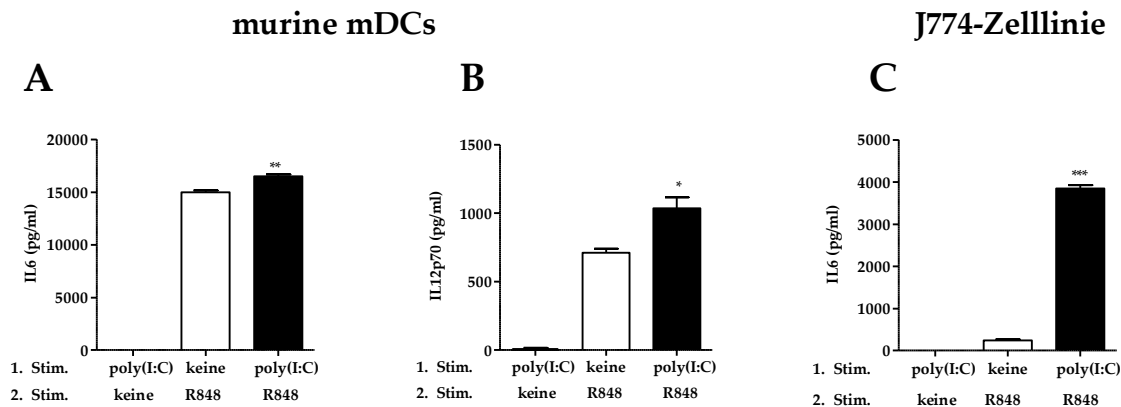


**Abbildung 4: Präkonditionierung mit poly(I:C) erhöht nachfolgende Zytokin-Antwort auf R848.**

Murine Knochenmarkszellen (C57BL/6) wurden nicht oder mit 200 µg/ml poly(I:C) vorbehandelt (1. Stimulation). Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit 0,1 µg/ml R848 (R848) restimuliert oder unstimuliert gelassen (2. Stimulation). Weitere 24 Stunden später erfolgte die Abnahme der Überstände und die Analyse auf die Konzentration von IL6 (A) und IL12p70 (B) mittels ELISA.

Das Experiment zeigt, dass beide Zytokine in der mit poly(I:C) vorbehandelten Gruppe signifikant höher als in der unbehandelten Gruppe sind. Diese Erhöhung der Zytokinausschüttung nach vorheriger poly(I:C)-Gabe zeigt, dass poly(I:C) die Zellen empfindlicher für einen nachfolgenden R848-Stimulus macht. Dieser Effekt wird als *Priming-Effekt* bezeichnet. Ein additiver Effekt kann bei diesem Versuchsaufbau nicht vorliegen, da das Zellmedium vor der Stimulation mit R848 komplett ausgetauscht und durch die Negativkontrolle eine über 24 Stunden hinaus andauernde Zytokinsekretion als Reaktion auf poly(I:C) ausgeschlossen wird.

Um zu untersuchen, ob dieser *Priming-Effekt* auch in der für die bei der Virusabwehr wichtigen Zellgruppe der mDCs vorhanden ist, wurden Knochenmarkszellen mittels IL4 und GM-CSF zu mDCs differenziert. Diese wurden unter den gleichen Bedingungen wie im ersten Versuch (Abbildung 4) stimuliert. Wieder wurden IL6 und IL12p70 bestimmt. Auch die murine Makrophagen-Zelllinie J774 wurde in dieser Hinsicht untersucht.



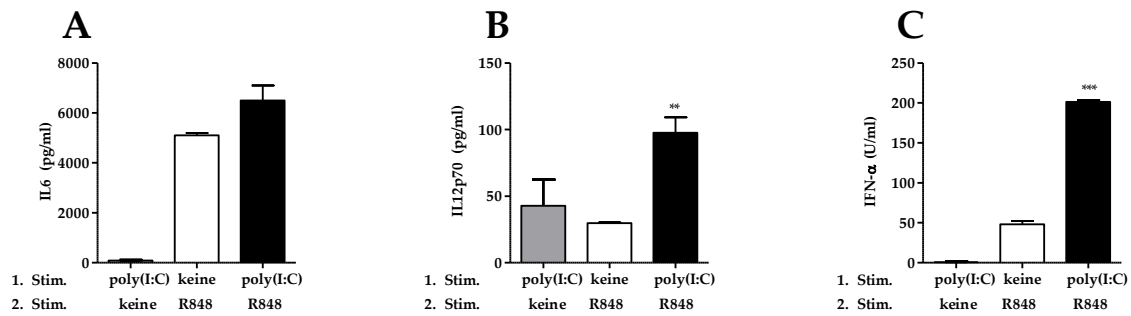
**Abbildung 5: Priming-Effekt in mDCs und J774-Makrophagen.**

Beide Zelltypen wurden nicht oder mit 200 µg/ml poly(I:C) vorbehandelt (1. Stimulation). Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit 0,1 µg/ml R848 restimuliert oder unstimuliert gelassen (2. Stimulation). Weitere 24h später erfolgte die Abnahme der Überstände und die Analyse von IL6 (A) und IL12p70 (B) aus murinen mDCs sowie IL6 aus Zellen der J774-Zelllinie (C) mit ELISA.

Auch hier kann man eine signifikante Steigerung der Sekretion von IL6 und IL12p70 nach Präkonditionierung mit poly(I:C) beobachten. Der *Priming-Effekt* zeigt sich also nicht nur im Knochenmark, sondern auch in aus Knochenmark gewonnenen myeloiden DC und in Makrophagen aus der J774-Zelllinie.

### 3.1.2. PLASMAZYTOTOIDE DENDRITISCHE ZELLEN WERDEN ZUSÄTZLICH FÜR DIE IFN-SEKRETION SENSITIVIERT

Plasmazytoide DC sind eine B220-positive Subgruppe der DC. Sie sind *in vivo* für einen Großteil der PAMP-induzierten IFN-Antwort verantwortlich, unter anderem, da sie als einziger Zelltyp auf einen TLR7-Stimulus hin IFN bilden können (siehe 1.2.1). Deshalb wurde der *Priming-Effekt* in murinen pDCs untersucht. Neben den proinflammatorischen Zytokinen wurde IFN-α gemessen.



### Abbildung 6: Priming-Effekt in pDCs

IL6 (A), IL12p70 (B) und IFN- $\alpha$  (C) in aus murinem Knochenmark mittels h-FLT3L differenzierten pDCs. Die pDCs wurden nicht oder mit 200  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) vorbehandelt (1. Stimulation). Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  R848 restimuliert oder unstimuliert gelassen (2. Stimulation). Weitere 24 Stunden später erfolgte die Abnahme der Überstände und die Analyse mit ELISA.

IL12p70 und IFN- $\alpha$  sind in den poly(I:C)-behandelten pDCs im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant erhöht, auch IL6 wird in der poly(I:C)-Gruppe vermehrt produziert. Eine Präkonditionierung mit poly(I:C) hat also eine verstärkende Wirkung auf nachfolgende Stimulation des TLR7, der neben R848 auch ein Rezeptor für einzelsträngige virale RNA ist.

Doch TLR7 ist nicht der einzige zelluläre Rezeptor für RNA viralen Ursprungs. Die RLH RIG-I, die sich im Zytoplasma befindet, erkennt ebenfalls einzelsträngige RNA. Es liegt also nahe, auch die Auswirkung der poly(I:C)-Präkonditionierung auf die RIG-I-Stimulation zu untersuchen.

### 3.1.3. KONDITIONIERUNG MIT POLY(I:C) FÜHR ZU EINER VERMINDERTEN ANTWORT

#### AUF PPP-RNA: *BLOCKING*-EFFEKT

Es wurden nach einem analogen Muster wie oben verschiedene Zellgruppen für 24 Stunden mit poly(I:C) vorbehandelt. Danach wurden die Zellen mit ppp-RNA, einem synthetischen Liganden der zytoplasmatischen Helikase RIG-I, restimuliert, die Zytokinantwort wurde mittels ELISA bestimmt. Damit die ppp-RNA ins Zytosol gelangt, wurde es im Komplex mit Lipofectamine RNAiMAX transfiziert.

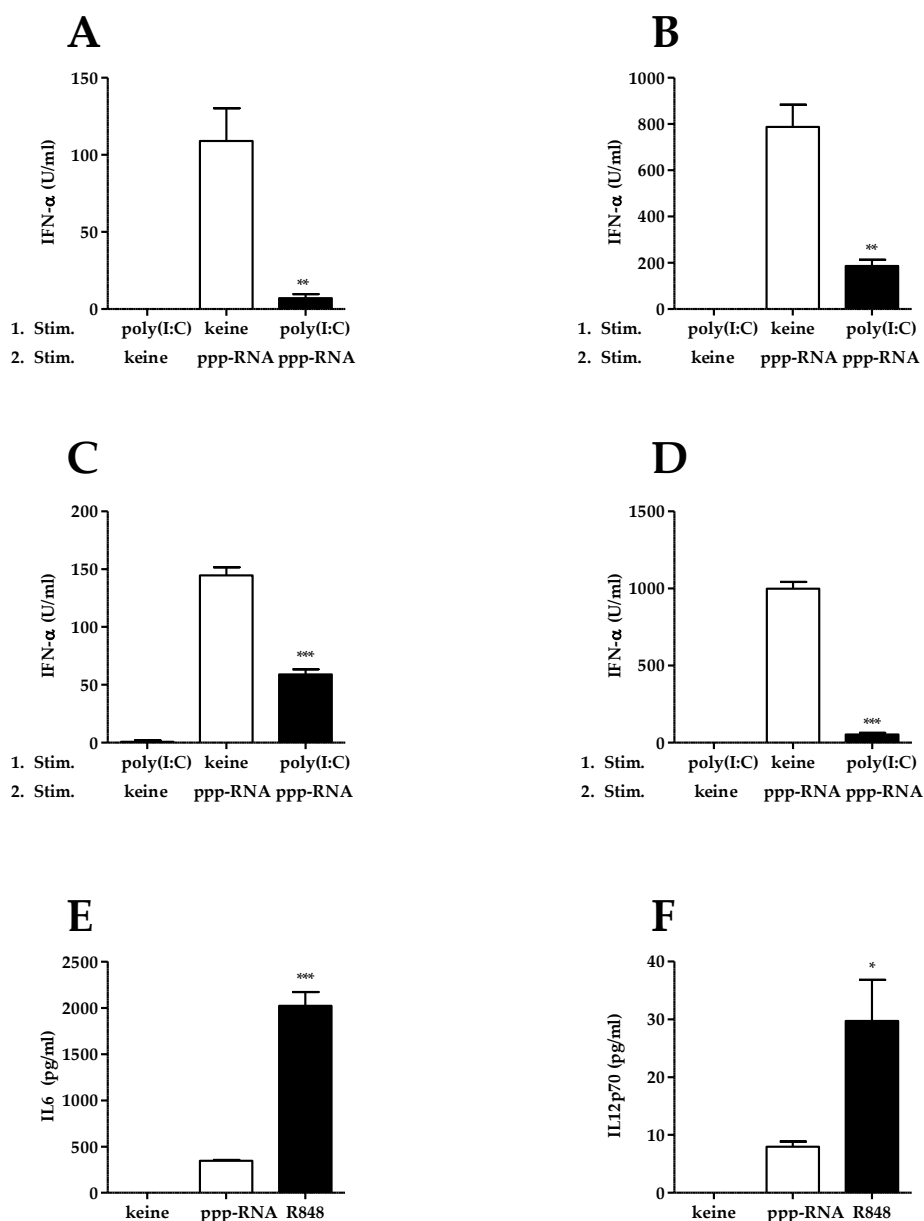


Abbildung 7: Präkonditionierung mit poly(I:C) verhindert eine nachfolgende IFN-Ausschüttung bei RIG-I-Stimulation.

*IFN- $\alpha$  in mDCs (A), Knochenmark (B), pDCs (C) und J774-Makrophagen (D).*

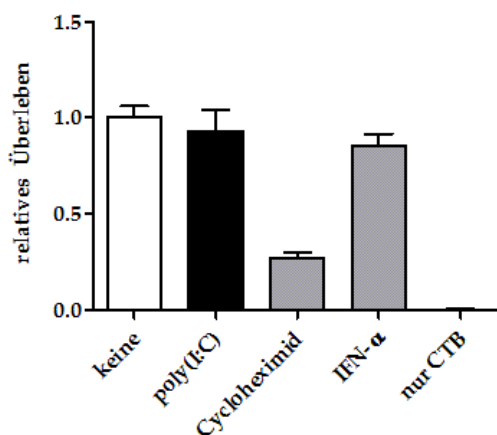
*IL6 (E) und IL12p70 (F) in Knochenmark nach ppp-RNA und R848-Stimulation.*

*A-D: Die verschiedenen Zellen wurden in einer 96-Well-Platte in Kultur genommen. Dann wurden sie nicht oder mit 200  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) für 24 Stunden vorbehandelt (1. Stimulation). Anschließend wurden sie gewaschen und mit 200 ng/ml ppp-RNA (siehe 2.2.6) im Komplex mit Lipofectamine RNAiMAX restimuliert oder unstimuliert gelassen (2. Stimulation). Weitere 24 Stunden später erfolgte die Abnahme der Überstände und die Analyse mit ELISA.*

*E + F: Murines Knochenmark wurde in einer 96-Well-Platte in Kultur genommen und mit ppp-RNA, R848 oder nicht stimuliert. 24 Stunden später erfolgte die Abnahme der Überstände und die Analyse mit ELISA.*

In allen überprüften Zellgruppen war nach poly(I:C)-Präkonditionierung die IFN- $\alpha$ -Antwort signifikant unterdrückt. Dieser Effekt zeigte sich nicht für andere Zytokine wie IL6 oder IL12p70, die ohnehin nach Stimulation mit ppp-RNA nur schwach ausgeschüttet werden (Abbildung 7; E und F). Dieser Effekt wird als *Blocking-Effekt* bezeichnet. Hier wird gezeigt, dass er in einer Reihe von immunologisch relevanten Zelltypen auslösbar ist: im Knochenmark, in daraus gewonnenen mDCs und pDCs und in der Makrophagen-Zelllinie J774.

Eine mögliche Erklärung für den Block wäre, dass poly(I:C) das Überleben der Zellen beeinträchtigt, die dann natürlich weniger IFN produzieren. Um dies zu überprüfen, wurden Knochenmarkszellen nach obigem Experiment mit CellTiterBlue (CTB) auf ihre *Viability* überprüft.



**Abbildung 8: Die Behandlung mit poly(I:C) beeinflusst das Überleben der Zellen nicht.**

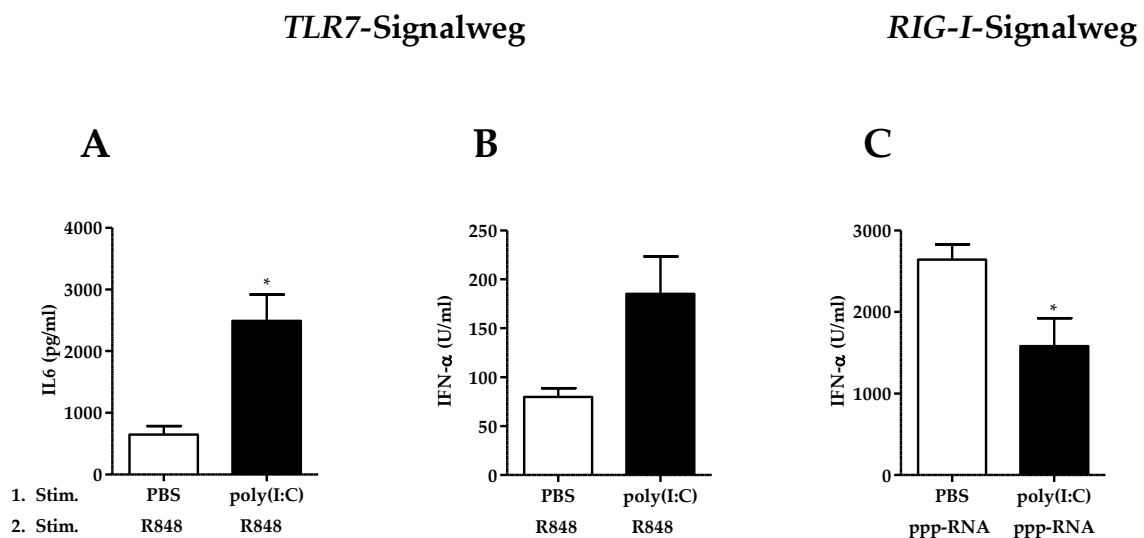
Knochenmarkszellen wurden nach der 24-stündigen Behandlung mit 200  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) mit 5  $\mu\text{l}$  pro Well CTB behandelt. Nach 6 h Stunden wurde die Platte im Photometer ausgelesen und das relative Überleben im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen (=1.0) berechnet.

Das Überleben der Zellen wird weder durch poly(I:C) noch durch IFN- $\alpha$  signifikant negativ beeinflusst. Somit ist es unwahrscheinlich, dass poly(I:C) die IFN- $\alpha$ -Sekretion durch eine toxische Wirkung inhibiert.

Da beide Effekte – der *Priming-Effekt* sowie der *Blocking-Effekt* – nun in verschiedenen immunologischen Zelltypen nachgewiesen wurden, wurden die Effekte auch in *in vivo* untersucht, um ein physiologisch relevanteres Modell heranzuziehen,

### 3.1.4. PRÄKONDITIONIERUNG MIT POLY(I:C) FÜHRT AUCH *IN VIVO* ZU EINER REPROGRAMMIERUNG DER IMMUNANTWORT

Um die beiden Effekte *in vivo* zu untersuchen, wurden C57BL/6-Mäuse in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe blieb unbehandelt, der anderen wurde poly(I:C) i.p. injiziert. 24 Stunden später bekamen die Tiere R848 i.p. oder ppp-RNA i.v. injiziert. Es wurden die Serumwerte der Zytokine IL6 und IFN- $\alpha$  drei Stunden nach der R848- bzw. ppp-RNA-Stimulation gemessen und verglichen.

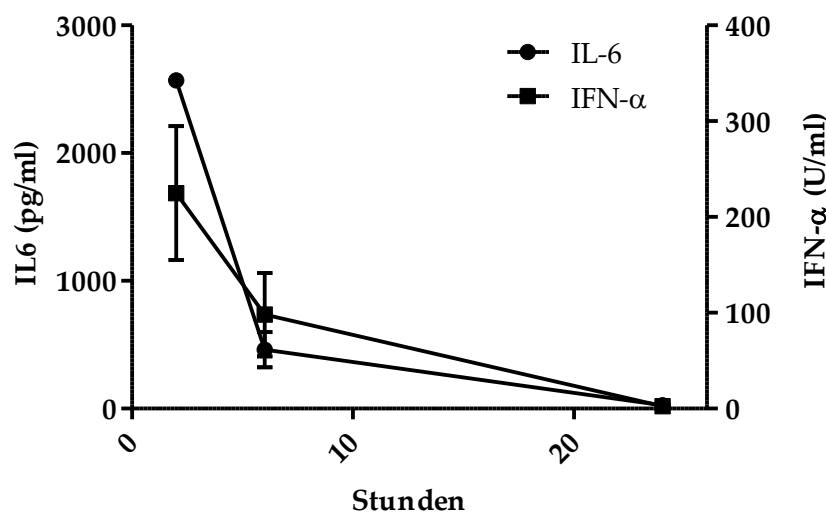


**Abbildung 9: Der Priming- und Blocking-Effekt im *in vivo*-Modell.**

Mäuse ( $n=3$  pro Gruppe) erhielten eine Injektion mit PBS oder 250  $\mu$ g poly(I:C) i. p. 24 Stunden später wurde den Mäusen 25  $\mu$ g R848 s. c. (A und B) oder ppp-RNA mit *in vivo* jetPEI (C) injiziert. Weitere 3 Stunden später wurde den Tieren Blut entnommen. Die Grafiken zeigen die Konzentration von IL6 und IFN- $\alpha$  im Serum, gemessen mittels ELISA.

Die IL6- und IFN- $\alpha$ -Antwort auf R848 war nach poly(I:C)-Präkonditionierung signifikant gesteigert. Im Gegensatz dazu war die IFN- $\alpha$ -Antwort auf ppp-RNA deutlich erniedrigt. Der *Priming*- und der *Blocking*-Effekt sind also keine reinen *in vitro*-Effekte.

Die Injektion von poly(I:C) löst *in vivo* – im Gegensatz zu *in vitro* – eine kräftige Zytokin-Antwort aus (siehe auch 4.2.6). Um auszuschließen, dass die Zytokin-Antwort auf poly(I:C) zeitlich mit der von R848 überlagert und somit keine Reprogrammierung ist, sondern ein synergistisches Phänomen beobachtet wird, wurde in einem Versuch der zeitliche Verlauf der Zytokinkonzentration im Blut der Mäuse nach einer poly(I:C)-Injektion beobachtet:



**Abbildung 10:** 24 Stunden nach poly(I:C)-Injektion sind keine Zytokine mehr im Blut nachweisbar.

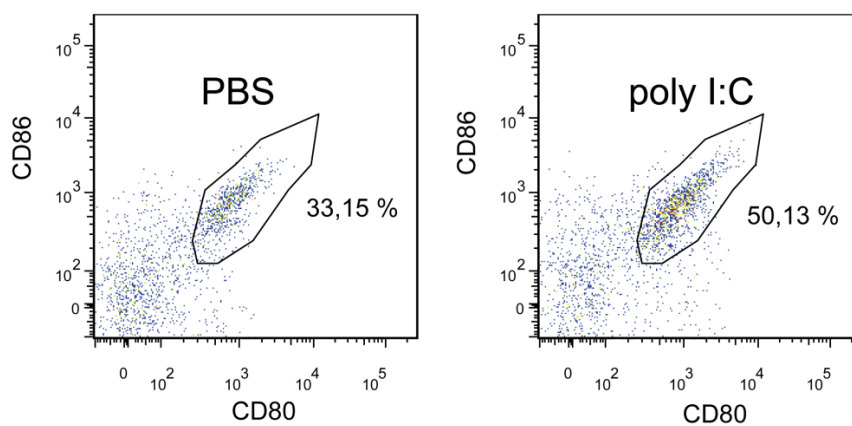
Mäuse ( $n=3$ ) wurden mit 250  $\mu\text{g}$  poly(I:C) i.p. injiziert. Nach 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden wurde den Mäusen Blut entnommen und die Zytokinkonzentrationen im Serum mit ELISA gemessen. Die Kontrolle ( $n=1$ ) blieb unbehandelt. Sie ist hier nicht dargestellt, da keine Zytokine im Serum nachweisbar waren.

Nach einer hohen Zytokinkonzentration bei  $t=2$  h fiel die Konzentration schnell ab. Nach 24 Stunden waren kein IL6 und kein IFN- $\alpha$  mehr im Blut nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass der *Priming*-Effekt auch *in vivo* nicht durch eine Überlagerung der Zytokin-Antworten oder Synergie entsteht, sondern poly(I:C) die Reaktion auf R848 moduliert.



### 3.1.5. DER *PRIMING*-EFFEKT FÜHRT ZU EINER HÖHEREN EXPRESSION VON DC-AKTIVIERUNGSMARKERN

Doch nicht nur eine erhöhte Zytokinsekretion ist für eine potentielle Anti-Tumor-Therapie mittels PRR wichtig. Auch die Aktivierung der Zellen der angeborenen Immunität spielt eine Rolle (Murphy et al. 2008). Daher wurde, um die Aktivierung der für eine effektive Immunantwort wichtigen mDCs festzustellen, eine durchflusszytometrische Analyse der typischen DC-Aktivierungsmarker CD80 und CD86 (siehe 1.1) durchgeführt, indem Mäuse unbehandelt blieben oder mit poly(I:C) konditioniert wurden.



**Abbildung 11:** Poly(I:C)-vorstimulierte Zellen reagieren mit einer verstärkten Expression von CD80 und CD86 auf R848.

Dargestellt ist der Anteil der CD80+CD86+ Zellen an CD11c+ Splenozyten. Milzen wurden aus Mäusen entnommen, die entweder 24 Stunden mit poly(I:C) und anschließend 3 Stunden mit R848 oder nur 3 Stunden mit R848 behandelt wurden. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CD11c, CD80 und CD86 markiert und mit Durchflusszytometrie analysiert.

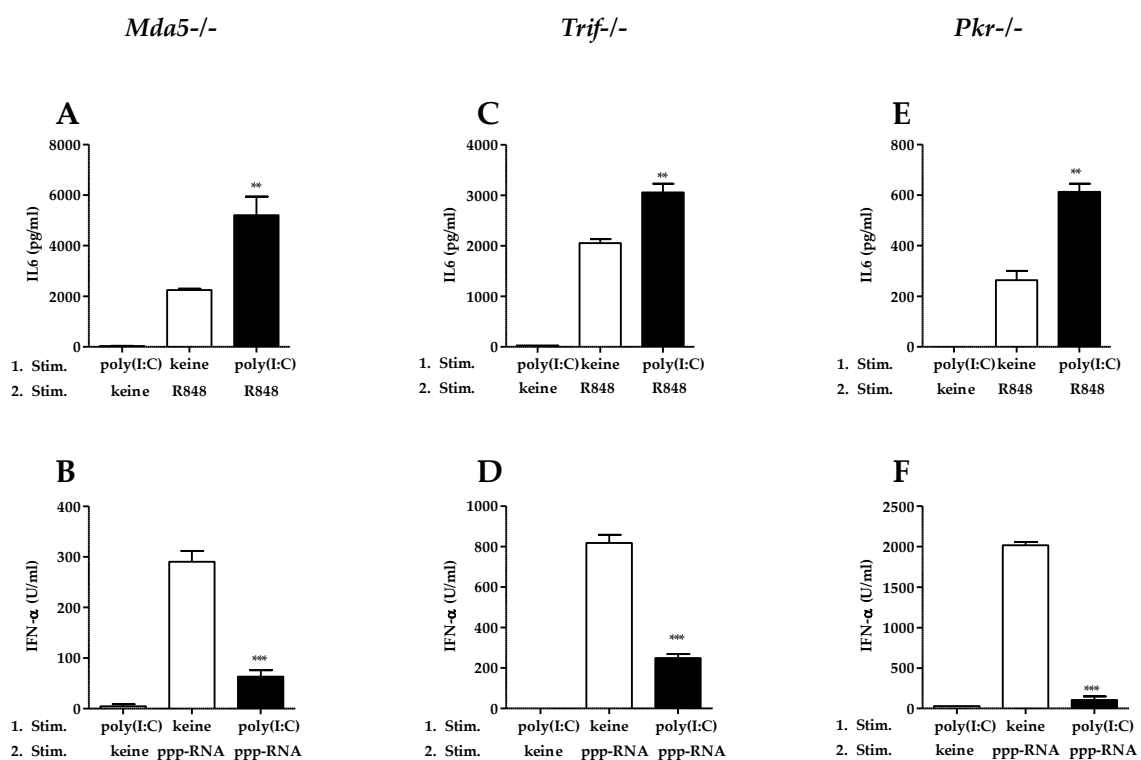
Der Anteil der CD80+CD86+ Zellen unter den CD11c+ Splenozyten stieg von 33,15 % auf 50,13 %, wenn die Mäuse vor dem R848-Stimulus mit poly(I:C) behandelt wurden. Der größere Anteil an aktivierten dendritischen Zellen deutet darauf hin, dass es sich nicht nur um eine isolierte Zytokin-Erhöhung handelt, sondern auch um einen Reifungs- und Aktivierungseffekt der dendritischen Zellen, der für eine koordinierte Immunantwort unabkömmlich ist.

Im weiteren Verlauf des Projekts sollten die molekularen Faktoren für den *Priming*-Effekt aufgeklärt werden.

## 3.2. MECHANISMEN DER SEQUENTIELLEN STIMULATION VON PRR

### 3.2.1. DIE REPROGRAMMIERUNG IST AUCH IN MDA5-, TRIF- UND PKR-KNOCKOUT-ZELLEN ZU BEOBACHTEN

Die Reprogrammierung durch poly(I:C) konnte nun in diversen Zellen gut dokumentiert werden. Doch über welchen Rezeptor poly(I:C) erkannt wird, um diese Reaktionen auszulösen, war noch offen. In der Literatur wurde eine Reihe von bekannten Rezeptoren beschrieben, die poly(I:C) bzw. dsRNA erkennen können. Drei der wichtigen Rezeptoren für poly(I:C) sind MDA5, TLR3 und die dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR) (Yu, Levine 2011). *Mda5*-, *Trif*- und *Pkr*-Knockout-Zellen wurden verwendet, um die Rolle dieser Rezeptoren in der Reprogrammierung zu untersuchen. TRIF ist ein Adapterprotein von TLR3 und für dessen Signalweg unbedingt erforderlich (Yamamoto et al. 2003).



**Abbildung 12: Die Reprogrammierung ist in vitro jeweils unabhängig von MDA5, TRIF und PKR**

IL6 (A) und IFN-α (B) in Knochenmarkszellen aus *Mda5*-Knockout-Mäusen

IL6 (C) und IFN-α (D) in Knochenmarkszellen aus *Trif*-Knockout-Mäusen.

IL6 (E) und IFN-α (F) in mDCs (CD11c<sup>+</sup>-Splenozyten) aus *Pkr*-Knockout-Mäusen.

Die verschiedenen Zellen wurden in einer 96-Well-Platte in Kultur genommen. Dann wurden sie

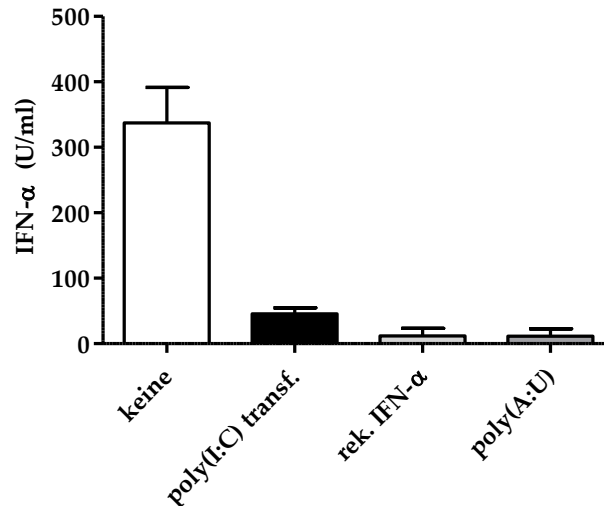
nicht oder mit 200 µg/ml poly(I:C) für 24 Stunden vorbehandelt (1. Stimulation). Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit 0,1 µg/ml R848 (obere Reihe), mit ppp-RNA (untere Reihe) restimuliert oder unbehandelt gelassen (2. Stimulation). Weitere 24 Stunden später erfolgte die Abnahme der Überstände und die Analyse mit ELISA.

In allen drei *Knockout*-Zellen sind beide Effekte noch deutlich vorhanden, die IL6-Zytokinkonzentrationen auf Stimulus mit R848 sind nach poly(I:C)-Präkonditionierung signifikant erhöht. Die IFN- $\alpha$ -Konzentrationen auf ppp-RNA-Stimulation hingegen erniedrigt. Da TRIF für das TLR3-Signaling notwendig ist, ist das ein starker Hinweis, dass TLR3 in den untersuchten Immunzellen *in vitro* nicht hinreichend und essentiell für die Reprogrammierung ist. Auch keiner der beiden Rezeptoren MDA5 und PKR scheint exklusiv und *in vitro* für den Block verantwortlich zu sein.

### 3.2.2. DAS GENEXPRESSIONSMUSTER VERÄNDERT SICH DURCH DIE STIMULATION MIT POLY(I:C) ÄHNLICH WIE MIT IFN- $\alpha$

Um dem Mechanismus des *Blocking-Effekts* weiter auf den Grund zu gehen, wurden Zellen nicht nur mit poly(I:C), sondern auch mit anderen Substanzen vorstimuliert. Auch wurde poly(I:C) mit Lipofectamine RNAiMAX komplexiert. Dadurch ist eine Transfektion in das Zytoplasma möglich, damit auch Rezeptoren dort angesprochen werden können und kein vorheriger Transport in das Zytoplasma nötig ist. Weiter wurde poly(A:U) verwendet, welches als reiner TLR3-Agonist beschrieben wurde (Perrot et al. 2010).

Kim et al. beschrieben einen IFN-abhängigen *Priming*-Effekt von poly(I:C), der die Reaktion auf *Stimulation* von NOD1/2 erhöht (Kim et al. 2011). Es sollte deshalb ebenfalls untersucht werden, ob in unserem Modell der *Priming*- und der *Blocking-Effekt* durch IFN vermittelt wird. Deshalb wurde ebenfalls rekombinantes IFN- $\alpha$  zur Präkonditionierung verwendet.

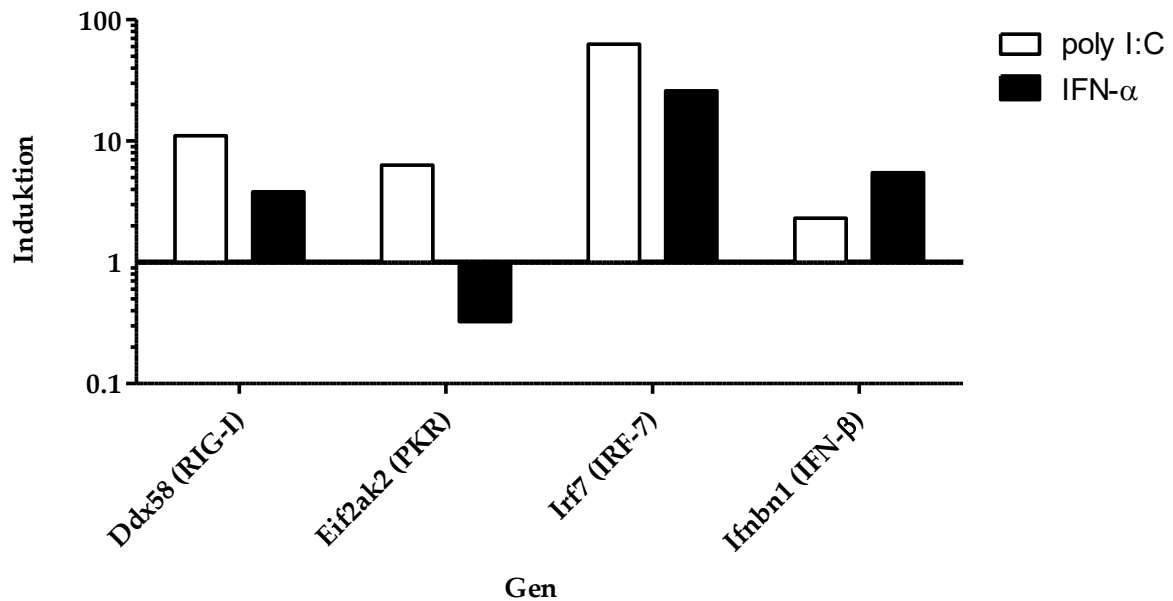


**Abbildung 13:** Der Blocking-Effekt wird auch durch IFN- $\alpha$ , transfiziertes poly(I:C) und poly(A:U) ausgelöst.

Murine Knochenmarkszellen (C57BL/6) wurden mit Medium (weiße Balken) oder 250  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) (schwarze Balken), rekombinantem IFN- $\alpha$  (hellgrauer Balken) oder poly(A:U) (dunkelgrauer Balken) vorbehandelt. Nach 24 Stunden wurden sie gewaschen und mit ppp-RNA im Komplex mit Lipofectamine RNAiMAX restimuliert. Die Komplexierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Weitere 24 Stunden später erfolgte die Abnahme der Überstände und die Analyse auf die Konzentration von IFN- $\alpha$  mittels ELISA.

Der Blocking-Effekt kann also, wie hier gezeigt, auch durch direkt in das Zytoplasma transfiziertes poly(I:C) ausgelöst werden. Die in der Literatur als reiner TLR3-Agonist beschriebene doppelsträngige RNA poly(A:U) hat den gleichen Effekt. Interessanterweise löst auch rekombinantes IFN- $\alpha$  einen Block auf nachfolgende ppp-RNA-Stimulation aus. Dieses Ergebnis ließ auf eine Beteiligung von IFN am Entstehen des Effekts vermuten. Der Priming-Effekt ließ sich durch diese Substanzen nicht auslösen (Daten nicht gezeigt).

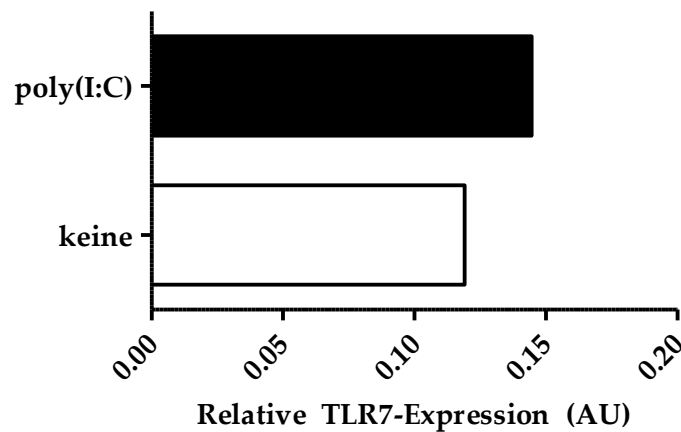
Um dieser Vermutung einer Beteiligung von Typ-1-IFN am Blocking-Effekt nachzugehen, wurde in einer qRT-PCR die Expression von wichtigen, mit IFN beeinflussbaren Genen untersucht. Dazu wurden murine mDCs mit poly(I:C) oder IFN- $\alpha$  behandelt und im Vergleich zu einer unbehandelten Referenzgruppe betrachtet. Mittels qRT-PCR wurde die Gene von RIG-I (*Ddx58*), PKR (*Eif2ak2*), IRF7 (*Irf7*) und IFN- $\beta$  (*Ifnb1*) untersucht.



**Abbildung 14:** Durch poly(I:C) und IFN- $\alpha$  induziertes Genexpressionsmuster im Vergleich. qRT-PCR von murinen mDCs, die für 24 Stunden mit poly(I:C) (weißer Balken) oder IFN- $\alpha$  (schwarzer Balken) stimuliert wurden, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Als Referenzgen diente Hprt. Durchschnittswerte aus zwei Messungen sind gezeigt.

Das Expressionsmuster der in Abbildung 14 gezeigten Gene ähnelt dem durch IFN- $\alpha$  ausgelösten Muster. Interessanterweise wird die Expression der RIG-I-mRNA, nicht herunter-, sondern hochreguliert. Daher wäre eine stärkere Zytokin-Reaktion auf RIG-I-Stimulation zu erwarten. Trotzdem löst der Signalweg aber keine IFN-Antwort mehr aus.

Ein möglicher Mechanismus des *Priming-Effekts* wäre die Hochregulierung von TLR7. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einem getrennten Versuch die Veränderung der TLR7-mRNA nach poly(I:C)-Stimulation quantitativ bestimmt.



**Abbildung 15: TLR7-mRNA ist nach poly(I:C)-Stimulation nur wenig erhöht.**

Murine mDCs wurden für 24 Stunden mit poly(I:C) stimuliert oder unstimuliert gelassen. Danach wurden die Zellen lysiert, es wurde RNA gewonnen und eine qRT-PCR durchgeführt. Als Referenzgen wurde Hprt verwendet. Das Ergebnis entspricht einer 1,21-fachen Hochregulierung der TLR7-mRNA. Durchschnittswerte aus zwei Messungen sind gezeigt.

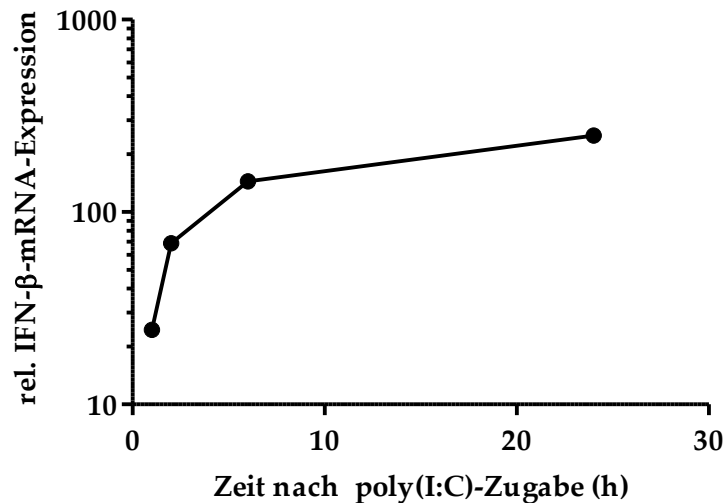
Eine Erhöhung der TLR7-mRNA um das 1,21-fache (Abbildung 15), wie sie hier beobachtet wird, ist noch kein biologisch signifikanter Unterschied. Der *Priming-Effekt* kommt also wahrscheinlich nicht ausschließlich durch eine Hochregulation des TLR7 zustande. Möglicherweise gibt es eine Veränderung im Signalweg, welche durch poly(I:C) in hohen Konzentrationen ausgelöst werden kann und die zu einer verstärkten Antwort auf R848 führt.

Diese Ergebnisse ließen die Vermutung einer IFN-Beteiligung wahrscheinlicher werden. Im folgenden Versuch wurde die Beteiligung von löslichen IFN auf beide Effekte näher beleuchtet.

### 3.2.3. DIE REPROGRAMMIERUNG UND IHRE ABHÄNGIGKEIT VON LÖSLICHEM IFN-A UND IFN-B

Da nach poly(I:C)-Stimulation kein IFN- $\alpha$  in den Überständen der Zellen nachweisbar war, sollte zunächst eine quantitative qRT-PCR zeigen, ob, wie schnell und wie lange J774-Makrophagen nach einem poly(I:C)-Stimulus Typ-1-IFN bilden. Nach einem Stimulus wird als erstes IFN- $\beta$  gebildet, welches über den IFN-Rezeptor (IFN $\alpha$ R) in einer *Feed-Forward*-

Schleife die Bildung von IFN- $\beta$  antreibt. Daher wurde in diesem Experiment die IFN- $\beta$ -mRNA gemessen.

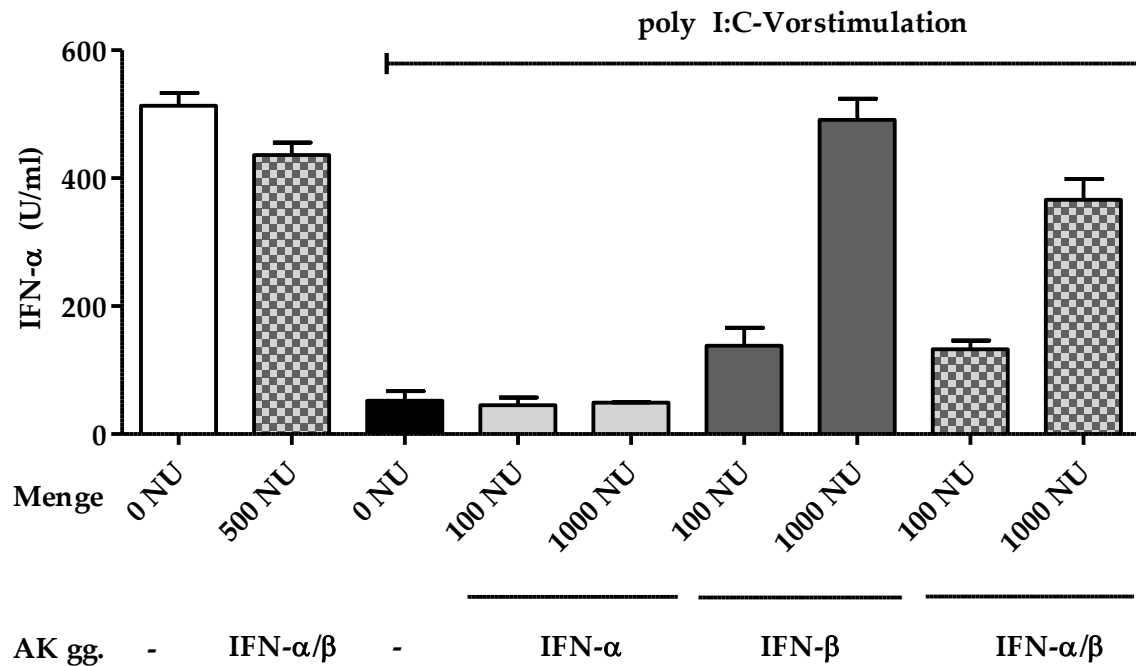


**Abbildung 16: IFN- $\beta$ -Kinetik in J774-Makrophagen.**

J774-Makrophagen wurden für 1, 2, 6 und 24 Stunden mit poly(I:C) stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR zur Quantifizierung von IFN- $\beta$ -mRNA durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Induktion von IFN- $\beta$ -mRNA im Verlauf der Zeit.

IFN- $\beta$ -mRNA wird rasch induziert. Die Expression fällt aber nicht sofort wieder ab, sondern bleibt für längere Zeit auf einem stabilen Level. Poly(I:C) ist also ein Stimulus für die Bildung von IFN- $\beta$ . Diese genetische Expression hält auch mindestens 24 Stunden an. Somit könnte in Zusammenschau mit den vorherigen Ergebnissen in Reaktion auf poly(I:C) gebildetes IFN- $\beta$  eine Bedeutung für den *Priming*- und den *Blocking-Effekt* haben.

Um diese Vermutung zu untersuchen wurden in J774-Makrophagen mithilfe von IFN-depletierenden Antikörpern getestet, ob die IFN einen Effekt auf den poly(I:C)-Block haben. Die Antikörper wurden gleichzeitig mit poly(I:C) zugegeben. Anschließend wurde – wie bereits in den vorangegangenen Versuchen – die IFN-Antwort auf ppp-RNA-Stimulation mit und ohne Vorstimulation durch poly(I:C) quantitativ gemessen.



**Abbildung 17: Durch poly(I:C) induziertes IFN-β vermittelt den Blocking-Effekt**

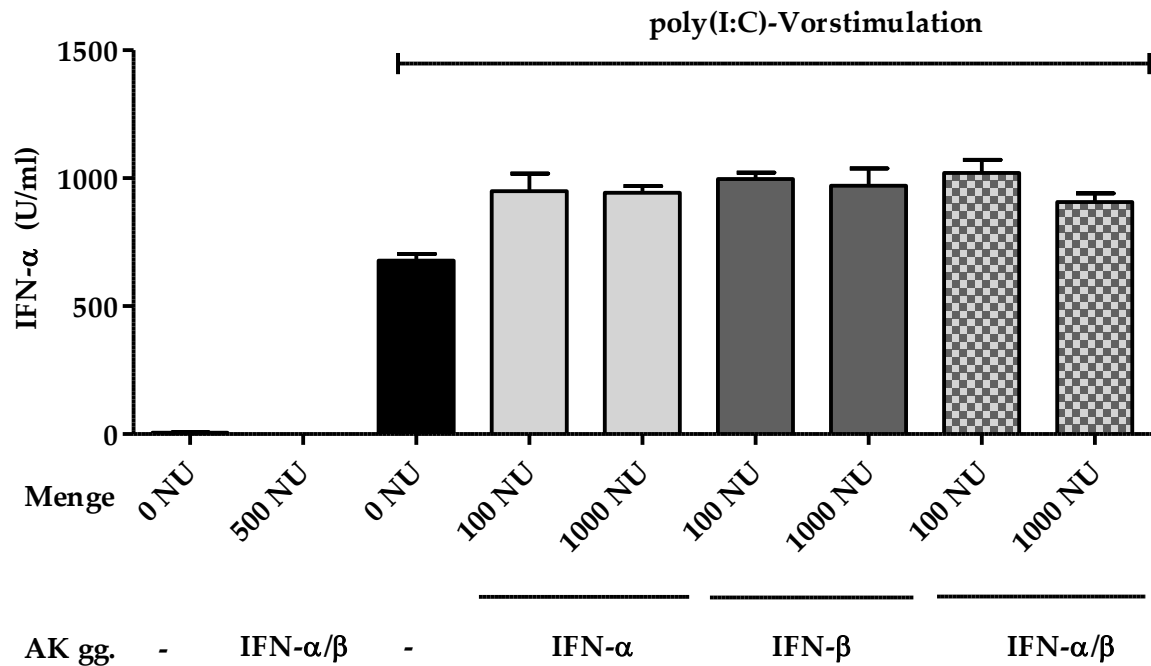
J774-Makrophagen (100 000/Well) wurden mit den im Graphen angegebenen Substanzen inkubiert. Die IFN-depletierenden Antikörper wurden jeweils in einer Konzentration von 100 NU/ml und 1000 NU/ml gleichzeitig mit poly(I:C) zugegeben (untere Zelle). Anschließend wurden alle abgebildeten Gruppen mit ppp-RNA restimuliert und weitere 24 Stunden später die Überstände analysiert. („AK gg.“ In der Legende bedeutet „Antikörper gegen“, entspricht depletierenden Antikörpern)

Der Block kann mit 100 neutralizing units (NU) der IFN-β-depletierenden Antikörper abgeschwächt und mit 1000 NU fast aufgehoben werden. Die IFN-α-Antikörper haben alleine keinen Effekt, beide Antikörper gemeinsam können ebenso wie die IFN-β-Antikörper den Blocking-Effekt dosisabhängig abschwächen.

IFN-β-depletierende Antikörper können also den Block verhindern – ganz im Gegensatz zu den IFN-α-depletierenden Antikörpern. Der Effekt ist dosisabhängig. 1000 NU des IFN-β-Antikörpers können den Block komplett lösen.

In einem analogen Versuch wurde untersucht, ob IFN-β auch den Priming-Effekt beeinflusst. Es wurde die gleiche Konzentration von poly(I:C) und den depletierenden Antikörpern verwendet wie in obigem Versuch.





*Abbildung 18: Durch poly(I:C) induziertes IFN-β vermittelt den Priming-Effekt unter den untersuchten Bedingungen nicht.*

J774-Makrophagen (100 000/Well) wurden mit den im Graphen angegebenen Substanzen inkubiert. Die IFN-depletierenden Antikörper wurden jeweils in einer Konzentration von 100 NU/ml und 1000 NU/ml gleichzeitig mit poly(I:C) zugegeben (untere Zelle). Anschließend wurden alle abgebildeten Gruppen mit R848 restimuliert und weitere 24 Stunden später die Überstände analysiert.

(„AK gg.“ In der Legende bedeutet „Antikörper gegen“, entspricht depletierenden Antikörpern)

Es wurde allerdings keine Dosisfindung durchgeführt, die hier eingesetzten Konzentrationen der depletierenden Antikörper ließen keinen Einfluss auf den Priming-Effekt erkennen.

### 3.3. SEQUENTIELLE *STIMULATION* VON PRR IN DER TUMORTHERAPIE

Der *Priming-Effekt* durch die sequentielle Gabe von poly(I:C) und R848 hat sich in den bisherigen Versuchen dieser Arbeit in vielen unterschiedlichen Zelltypen und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt. Durch die sequentielle Stimulation unterschiedlicher MyD88-abhängiger und –unabhängiger TLR ließ sich eine deutlich höhere Zytokinausschüttung und eine verstärkte Aktivierung von DC im Vergleich zu den Einzelsubstanzen nachweisen.

Da für eine Tumorummuntherapie die Sekretion von Zytokinen und die DC-Aktivierung wichtig sind, liegt es nahe, den *Priming-Effekt* in einem murinen Tumormodell zu untersuchen. Hierzu wurde ein murines CT26-Modell eingesetzt, an dem in der Arbeitsgruppe bereits Untersuchungen zur Tachyphylaxie durchgeführt wurden (Bourquin et al. 2011). Die Sequentielle Therapie wurde mit Monotherapien mit R848 und poly(I:C) verglichen. Poly(I:C) wurde in einfacher und doppelter Dosis eingesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit hinsichtlich Wirksamkeit und Toxizität zur sequentiellen Therapie herstellen zu können.

Im Folgenden nun das Therapieschema dieses Versuchs:

**Tabelle 4: Therapieschema des Tumorversuchs**

Gruppe / Tag	7	8	12	13	17	18
<b>Sequentielle Ther.</b>	poly(I:C)	R848	poly(I:C)	R848	poly(I:C)	R848
<b>Nur R848</b>	R848	R848	R848	R848	R848	R848
<b>poly(I:C) 1x</b>	-	poly(I:C)	-	poly(I:C)	-	poly(I:C)
<b>poly(I:C) 2x</b>	poly(I:C)	poly(I:C)	poly(I:C)	poly(I:C)	poly(I:C)	poly(I:C)
<b>Unbehandelt</b>	-	-	-	-	-	-

Die Gesamtmenge der eingesetzten Substanzen kann folgender Tabelle entnommen werden:

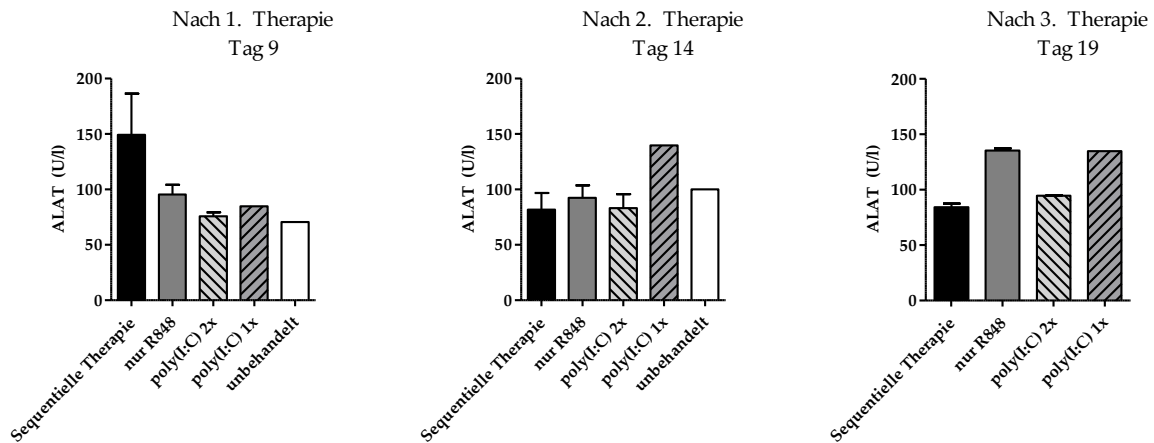
*Tabelle 5: Gesamtmenge der eingesetzten Adjuvantien*

	Gesamtmenge poly(I:C)	Gesamtmenge R848
<b>Sequentielle Ther.</b>	600 µg	75 µg
<b>Nur R848</b>	-	150 µg
<b>poly(I:C) 1x</b>	600 µg	-
<b>poly(I:C) 2x</b>	1200 µg	-
<b>Unbehandelt</b>	-	-

Zur Auswertung des Versuches wurde einerseits die Lebertoxizität durch Messung der Serumaktivität der Alanin-Aminotransferase (ALAT) gemessen (3.3.1), andererseits wurde die Ausdehnung der Tumore regelmäßig gemessen und ausgewertet (3.3.2).

### 3.3.1. DIE SEQUENTIELLE THERAPIE IST NICHT LEBERTOXISCHER ALS DIE EINZELSUBSTANZEN

Ein Problem der Tumorimmuntherapie mit PRR, im Besonderen mit poly(I:C), ist die Lebertoxizität. Es wurde über gesteigerte Serumwerte von Transaminasen nach i.v.-Verabreichung in Menschen berichtet (Freeman et al. 1977). Um die Toxizität der verschiedenen Therapien zu vergleichen, wurden den Mäusen (Abbildung 20) einen Tag nach jeder Therapieeinheit Blut entnommen, das Serum wurde eingefroren konserviert und nach Abschluss des Experiments die Aktivität der Transaminase ALAT (GPT) im aufgetauten Serum bestimmt. Diese ist ein empfindlicher Marker für eine Leberzellschädigung (Ozer et al. 2008).



**Abbildung 19: ALAT-Aktivität zeigt zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied.**

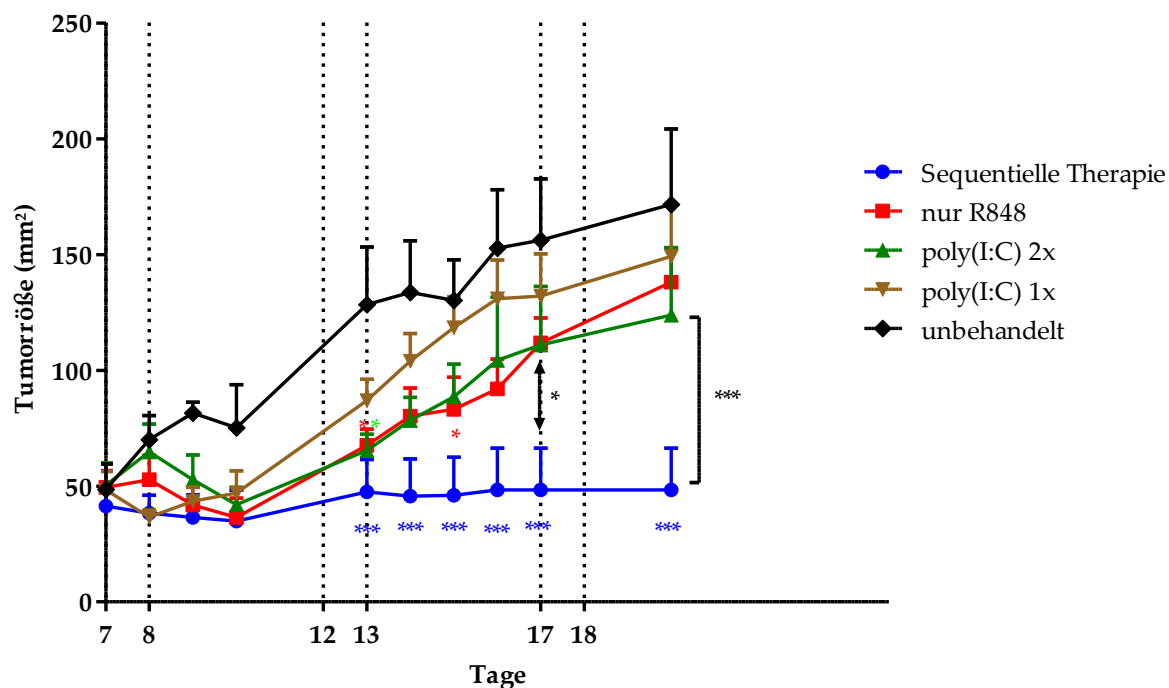
1. Therapie: Tag 9 (A); 2. Therapie: Tag 14 (B); 3. Therapie: Tag 19 (C)

Die ALAT-Aktivität wurde von der Abteilung für Klinische Chemie der LMU München bestimmt. In der unbehandelten Gruppe konnte an Tag 19 bei keinem Tier mehr Blut entnommen werden, deshalb fehlt die Gruppe in der Grafik. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind in keinem Fall signifikant.

Zwischen den ALAT-Werten nach den verschiedenen Therapien lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Keine der Therapien sticht also als besonders lebertoxisch hervor. Die sequentielle Therapie erkaufte sich die erhöhte Wirksamkeit im Vergleich zu einer poly(I:C)- oder R848-Monotherapie nicht durch eine erhöhte Hepatotoxizität.

### 3.3.2. DER PRIMING-EFFEKT LÄSST SICH FÜR EINE EFFEKTIVE ANTI-TUMOR-THERAPIE NUTZEN

Trotz der nicht erhöhten Toxizität konnte aber eine starke Wirkung auf das Tumorstadium der Mäuse festgestellt werden:



**Abbildung 20: Sequentielle Stimulation mit poly(I:C) und R848 verhindert effektiv das Wachstum von CT26-Tumoren.**

BALB/c-Mäuse ( $n=5$  pro Gruppe) wurden mit je  $2,5 \cdot 10^5$  CT26-Tumorzellen inokuliert (Tag 0). An Tag 7 begann die Behandlung mit je 200  $\mu\text{g}$  poly(I:C) und 25  $\mu\text{g}$  R848 (Sequentielle Therapie) oder mit jeweils nur R848 oder poly(I:C) nach dem Schema in Tabelle 4. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Die gestrichelten vertikalen Linien markieren die Tage, an denen eine Therapie stattfand. An den jeweils angegebenen Zeitpunkten wurde der Durchmesser des Tumors gemessen. Signifikanzniveaus im Vergleich zur unbehandelten Gruppe.

Schon nach dem 13. Tag der Behandlung war das Tumorwachstum in den mit der sequentiellen Therapie behandelten Tieren hochsignifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Das Tumorwachstum in der sequentiellen Therapie konnte nahezu angehalten werden. Die Einzeltherapien hatten keinen dauerhaften Einfluss auf das Tumorwachstum. In ihrer Wirksamkeit unterschieden sie sich nicht signifikant voneinander.

In einem weiteren, hier nicht beschriebenen Versuch wurden diese Ergebnisse – auch im Vergleich zu einer simultanen Anwendung von poly(I:C) und R848, die sehr toxisch war – bestätigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die sequentielle Gabe von poly(I:C) und R848 deutlich wirksamer ist als die Einzeltherapien. Eine therapielimitierende Tachyphylaxie tritt im Gegensatz zu einer R848-Monotherapie nicht mehr auf. In der Kombination mit R848 sind die eingesetzten 600  $\mu\text{g}$  poly(I:C) sogar effektiver als in einer Monotherapie mit der doppelten Menge, so dass weniger von dieser lebertoxischen Substanz eingesetzt werden

muss. Somit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine sequentielle Gabe von MyD88-abhängigen und –unabhängigen TLR-Liganden ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Tumorummuntherapie sein kann.

## 4. DISKUSSION





#### 4.1. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von PRR mit poly(I:C) zu einer Reprogrammierung der betroffenen Zellen führt. Insbesondere konnten hier zwei Effekte beobachtet werden:

Erstens eine verstärkte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch Stimulation mit TLR7 mit R848. Dieser Effekt wurde in dieser Arbeit als *Priming-Effekt* bezeichnet.

Zweitens eine nahezu ausbleibende Zytokin-Antwort auf die Stimulation von RIG-I mit ppp-RNA. Dieser Effekt wurde in dieser Arbeit als *Blocking-Effekt* bezeichnet.

Diese Effekte lassen sich *in vitro* in murinen Knochenmarkszellen, in mDC und pDC sowie in J774-Makrophagen nachweisen. Außerdem zeigen sie sich ebenfalls *in vivo*, wie durch Bestimmung der Zytokin-Konzentration im murinen Serum erstmals nachgewiesen werden konnte. Hierbei konnte ein additiver Effekt ausgeschlossen werden, da zum Zeitpunkt des zweiten Stimulus die durch poly(I:C) induzierte Zytokin-Antwort nicht mehr im Serum nachweisbar war.

Der *Priming-Effekt* in pDCs bezieht sich nicht nur auf die proinflammatorischen Zytokine IL6 und IL12p70, sondern auch auf IFN- $\alpha$ , das in pDCs – im Gegensatz zu anderen Zellen – auch auf einen TLR7-Stimulus gebildet wird. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf mDCs kommt, die im Zusammenspiel der angeborenen mit der adaptiven Immunität eine Schlüsselrolle einnehmen.

Versuche in verschiedenen *Knockout*-Zellen konnten zeigen, dass *in vitro* TRIF (als Adapter für TLR3), MDA5 und PKR jeweils nicht alleinig verantwortlich für einen der beiden oben beschriebenen Effekte sein können.

Eine mögliche Erklärung für das Zustandekommen des *Priming-Effekts* wäre eine poly(I:C)-induzierte Hochregulierung von TLR7. Eine erhöhte Rezeptordichte könnte so die stärkere Zytokinantwort auf R848 erklären. Da aber durch poly(I:C) die TLR7-mRNA nicht bedeutend hochreguliert wird, ist diese These unwahrscheinlich.

Zwei Beobachtungen ließen eine Verknüpfung der Effekte mit IFN wahrscheinlich sein: Der *Blocking*-Effekt lässt sich auch durch IFN- $\alpha$  auslösen und das Expressionsmuster ausgewählter IFN-regulierter Gene nach Stimulus mit poly(I:C) verändert sich ähnlich wie bei IFN- $\alpha$ -Gabe.

Dass IFN- $\beta$ -mRNA in J774-Makrophagen auf poly(I:C) hin induziert wird und die Induktion über mindestens 24 Stunden anhält, stützt diese These. Die wesentliche, unabdingbare Beteiligung von IFN- $\beta$  konnte schließlich in einem Versuch mit neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- $\beta$  nachgewiesen werden: Der *Blocking*-Effekt war bei gleichzeitiger Gabe von poly(I:C) und den neutralisierenden Antikörpern konzentrationsabhängig inhibierbar. Für den *Priming*-Effekt konnte bei den gleichen Konzentrationen von poly(I:C) und der neutralisierenden Antikörper kein Effekt von IFN- $\beta$  nachgewiesen werden. Bei weiterführenden Experimenten in der Arbeitsgruppe konnte jedoch für niedrigere poly(I:C)-Konzentrationen doch eine Abhängigkeit von IFN- $\beta$  gezeigt werden (Hotz et al. 2015).

Mithilfe eines CT26-Tumormodells konnte sich schließlich nachweisen lassen, dass eine Tumorthherapie mit Poly(I:C), gefolgt von R848, deutlich effektiver ist als die einzelnen Substanzen. Ein Problem der systemischen Therapie mit Poly(I:C) ist die Toxizität (Robinson et al. 1976; Hartmann et al. 1986). Der erhöhte Therapie-Effekt durch sequentielle Stimulation wird aber nicht durch eine höhere Lebertoxizität erkauft, die Werte des parallel gemessenen Werts ALAT unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Dies zeigt, dass neben der zeitlichen Abfolge (Bourquin et al. 2011) auch die Reihenfolge der eingesetzten Substanzen in der Tumorthherapie mit TLR-Agonisten eine elementare Rolle spielt.

## 4.2. REPROGRAMMIERUNG VON REZEPTORSIGNALWEGEN DER ANGEBORENEN IMMUNITÄT

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten erstmals den *Priming*-Effekt in einer Reihe von verschiedener Immunzellen *in vivo* und seine Abhängigkeit von Typ-1-IFN nachweisen.

In anderen Studien wurden bereits in einzelnen Zelltypen Modifikationen des Verhaltens von Signalwegen durch Poly(I:C) beobachtet, die den hier beschriebenen *Priming*- und *Blocking*-Effekt ähneln. Dabei wurden mehrere Mechanismen des *Cross-Talks* beschrieben: Eine Stimulation mit Poly(I:C) oder einem Virus kann Signalwege anderer Rezeptoren modulieren und so eine Reprogrammierung auslösen. Dies kann unter anderem über die Sekretion von Zytokinen erfolgen. Insbesondere die Rolle von IFN wurde ausführlich diskutiert.

Weiter können wichtige Prozesse für das *Signaling* der Rezeptoren durch Poly(I:C) modifiziert werden. Dazu gehört beispielsweise die Translokation von TLR in das Endosom. Weitere Ursachen für eine Reprogrammierung können die Stimulation bislang unbekannter Rezeptoren oder direkte Bindungseffekte von Poly(I:C) sein. Die wichtigsten Ursachen werden nun im Folgenden diskutiert.

### 4.2.1. REPROGRAMMIERUNG DURCH REGULIERUNG VON SIGNALWEGEN

Insbesondere zwei Studien berichteten bereits über einen *Priming*-Effekt, der durch Regulierung der involvierten Signalwege zustande kommt:

Bagchi et al. konnten in aus Knochenmark gewonnen Makrophagen von C3H/HeJ-Mäusen eine erhöhte TNF- $\alpha$ - und IL6-Sekretion nach eine einer sequentiellen Stimulation von zunächst Poly(I:C) und anschließend PAL, CpG-DNA, Pam3Cys oder Flagellin feststellen (Bagchi et al. 2007). R848, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, kam nicht zum Einsatz. Parallel dazu ließ sich eine erhöhte Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern beobachten. Diese Effekte waren zumindest zum Teil von MyD88 abhängig, denn in MyD88-Knockout-Mäusen waren keine *Priming*- und Synergie-Effekte zwischen Poly(I:C) und Pam3Cys messbar. Dies widerspricht Ergebnissen, die wir mit R848 und Zellen von MyD88-Knockout-Mäusen erzielten (Daten nicht gezeigt). Die Autoren spekulieren, dass das *Priming* vor allem

durch eine Hochregulation gemeinsamer Proteine wie NF $\kappa$ B im Signalweg von MyD88-abhängigen und –unabhängigen TLR zustande kommt. Eine Toleranz fanden die Autoren hingegen nur bei Liganden, die den gleichen, MyD88-abhängigen Signalweg nutzen.

Die Arbeitsgruppe um Suet Ting Tan führte sehr ähnliche Experimente mit sequentieller Stimulation von TLR in murinen Knochenmarkszellen und RAW-Makrophagen durch (Suet Ting Tan et al. 2013). Insbesondere beobachteten sie auch eine Synergie, die vor allem unter TRIF- und MyD88-abhängigen TLR auftritt. Ihre Kernbeobachtungen sind:

Der optimale Zeitpunkt für den zweiten Stimulus liegt vier bis 24 Stunden nach dem ersten. Der genaue Zeitpunkt ist abhängig von Zellart und beobachteten Zytokinen. Die Zytokininduktion (IL6, IL12p40, TNF) nach sequentieller Stimulation ist höher als bei einzelnen Substanzen, auch wenn letztere in doppelter Dosis gegeben werden. Die Reihenfolge poly(I:C), gefolgt von R848, ist effektiver als R848, gefolgt von poly(I:C).

Poly(I:C) alleine löst – wie in dieser Arbeit - nur eine sehr schwache Zytokinreaktion aus. R848 kann sein volles Potential nur nach Präkonditionierung mit poly(I:C) ausschöpfen. Dieser *Priming*-Effekt ist abhängig von einer *De-novo*-Proteinsynthese: Unter Zugabe von Cycloheximid ließ sich das *Priming* aufheben.

Die Autoren stellen eine interessante These über die physiologische Bedeutung dieses Effekts auf: Das Sendai-Virus bildet im Laufe seines Replikationszyklus doppelsträngige RNA (TLR3-Ligand) und einzelsträngige RNA (TLR7-Ligand). Der *Priming*-Effekt führt somit zu einem optimalen Ansprechen der verteidigenden Zelle auf den Lebenszyklus dieses Virus. Dies lässt sich gut in Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit bringen: Poly(I:C) ist die Äquivalenz der doppelsträngigen RNA und R848 das der einzelsträngigen RNA. Auch der hier verwendete Zeitabstand von 24 Stunden lässt sich mit dieser These vereinbaren.

Auch existieren in der Literatur viele Beschreibungen von negativer Regulierung des IFN-Signalwegs. Einer davon ist der Abbau von MAVS, einem direkten Adapter-Protein von RIG-I. Mit dem Poliovirus infizierte Zellen bauen über ihr Proteasom unter Beteiligung von Caspasen MDA5 ab (Barral et al. 2007). In HeLa-Zellen transfiziertes Poly(I:C) führt zu einer Teilung und zum Abbau von MAVS und MDA5 (Scott, Norris 2008). Die Autoren diskutieren, ob dieser Effekt durch die Auslösung der Apoptose durch poly(I:C) zustande kommt. Diese von den Autoren beschriebenen Teilungs- und Abbauvorgänge führen

letztlich zu einer Unterbrechung des IFN-Signalwegs. Eine Reihe von Viren kann MAVS abbauen, um der Erkennung durch Helikasen zu entgehen.

Ein weiterer negativer Regulator der IFN-Antwort ist LGP2. Dieses Protein gehört wie RIG-I und MDA5 zur Familie der RLH. Es wird im Rahmen einer Virusinfektion verstärkt gebildet, kann aber wegen einer fehlenden Caspase-bindenden Domäne keine Zytokin-Reaktion auslösen. Nichtsdestotrotz kann es doppelsträngige Nukleinsäuren binden. Seine Überexpression verhindert so durch kompetitive Bindung virusinduziertes *Signaling* der anderen RLH, allerdings nicht von TLR3 (Rothenfusser et al. 2005).

Diese negativen Regulatoren können durchaus am *Blocking*-Effekt beteiligt sein. Allerdings konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Typ-1-IFN essenziell für den *Blocking*-Effekt sind. In einer im Anschluss in der Arbeitsgruppe entstandenen Publikation (Hotz et al. 2015) konnte gezeigt werden, dass sich durch eine Poly(I:C)-Stimulation die Phosphorylierung von TBK-1, einer Proteinkinase, die für die Aktivierung von IRF-3 und -7 und somit der IFN-Expression benötigt wird, nicht verändert. Daher ist ein Abbau von Proteinen wie LGP2 und MAVS weiter oberhalb im IFN-Signalweg eher unwahrscheinlich, da dadurch die Phosphorylierung von TBK-1 beeinflusst werden würde.

#### 4.2.2. REPROGRAMMIERUNG DURCH REGULIERUNG DER TRANSLOKATION

Obwohl TLR3 in geringen Mengen auch an der Plasmamembran exprimiert wird, ist die Translokation von Nukleinsäure-bindenden TLR in das Endosom eine Voraussetzung, um auf Nukleinsäuren reagieren zu können. Für die optimale Bindung der Nukleinsäure an die Rezeptoren ist ein saures Milieu Voraussetzung (Johnsen et al. 2006; Bouteiller et al. 2005).

Das Protein UNC93B1 ist wiederum nötig für diese Translokation in das Endosom und reguliert dadurch die TLR-Aktivität (Kim et al. 2008b). Pohar et al. konnten beobachten, dass in einer humanen Epithel-Zelllinie Poly(I:C) über die Stimulation von TLR3 die Transkription von UNC93B1 hochreguliert und somit die Translokation von TLR3 zur Plasmamembran begünstigt wird (Pohar et al. 2013). Außerdem wird die Lebensspanne von TLR3 und TLR9 verlängert. Zum Teil sind diese Effekte von löslichem IFN- $\beta$  abhängig. In Konsequenz führen diese Vorgänge in mit poly(I:C) oder IFN- $\beta$  vorbehandelten B-Zellen zu einer verstärkten Reaktion auf den TLR9-Agonisten CpG-DNA, also zu einem *Priming*-Effekt

ähnlich wie dem in dieser Arbeit beschriebenen. Die Autoren vermuten darum, dass die TLR3 induzierte Induktion von UNC931B die Ursache für den *Priming*-Effekt ist. Dies lässt sich mit der weiter oben diskutierten Studie von Suet Ting Tan vereinbaren, bei der ein *Priming* abhängig von einer *De-novo*-Proteinsynthese war. Dem gegenüber stehen die Daten dieser Arbeit, die *in vitro* eine Unabhängigkeit des Effektes von TRIF zeigen. Trotzdem wäre es möglich, dass die UNC931B-Hochregulierung nicht ausschließlich über die Stimulation von TLR3 erfolgt oder bislang nicht identifizierte Rezeptoren daran beteiligt sind.

#### 4.2.3. BETEILIGUNG VON BISLANG UNBEKANNTEN REZEPTOREN AN DER REPROGRAMMIERUNG

Weil drei der prominentesten Rezeptoren *in vitro* als alleinige Effektoren der Effekte ausgeschlossen werden konnten (MDA5, TRIF und PKR), ist es möglich, dass ein weiterer, bislang noch nicht beschriebener Rezeptor an der Reprogrammierung beteiligt ist. Dieser könnte seinen Effekt beispielsweise über eine Sekretion von IFN vermitteln.

Infrage kommt dabei DHX33: Liu et al. führten ein Screening über alle bekannten Mitglieder der DExD/H-Familie von Helikasen durch, zu denen auch RIG-I und MDA5 gehören (Liu et al. 2013). Dabei konnten sie DHX33 identifizieren, einen neuartigen Rezeptor doppelsträngiger RNA in murinen mDCs, der poly(I:C) bindet und von RIG-I/MDA5 unabhängig mit IPS-1/MAVS interagiert. Ein *Knockdown* von DHX33 mit shRNA führte zu einer stark verminderten IFN-Produktion in Reaktion auf poly(I:C) oder Reoviren. In einem Experiment unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings gezeigt werden, dass *in vivo* MDA5 der hauptsächlich verantwortliche Rezeptor ist. MDA5-*Knockout*-Mäuse wurden *in vivo* mit poly(I:C) behandelt. 24 Stunden später wurde den Mäusen das Knochenmark entnommen und *in vitro* mit R848 bzw. ppp-RNA stimuliert. In den weitere 24 Stunden später entnommenen Überständen war – im Gegensatz zu Wildtyp- und TRIF-*Knockout*-Mäusen – kein *Priming*- oder *Blocking*-Effekt mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass *in vivo* ein bislang unbekannter Rezeptor allenfalls zusätzlich an der Reprogrammierung beteiligt sein kann.

#### 4.2.4. EINFLUSS VON INTERFERONEN

IFN sind wichtige Botenstoffe in der viralen Abwehr. Sie sind außerdem nötig, um dendritische Zellen reifen zu lassen und in Richtung einer Th1-Antwort zu treiben, wenn sie mit poly(I:C) stimuliert werden (Longhi et al. 2009). Daher liegt es nahe, dass sie auch an der Regulierung der Nukleinsäure-bindenden Rezeptoren des angeborenen Immunsystems beteiligt sind. Die IFN-Bildung wird über eine Feedbackschleife verstärkt, für die der IFN- $\alpha$ -Rezeptor notwendig ist (Marié et al. 1998). Erst wird IFN- $\beta$  ausgeschüttet, welches an den IFN-Rezeptor bindet und dort zur massiven Ausschüttung von IFN- $\alpha$  führt. Diese Schleife kann durch IFN- $\beta$ -depletierende Antikörper unterbrochen werden. Der *Blocking*-Effekt hatte sich in einem Experiment dieser Arbeit (3.2.3) auch als abhängig von löslichem IFN- $\beta$  gezeigt. Nach Abschluss der experimentellen Phase dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch der *Priming*-Effekt von löslichen Typ-1-IFN abhängig ist. Dazu sind aber höhere Konzentrationen der depletierenden Antikörpern nötig, als sie hier verwendet wurden (Hotz et al. 2015).

Eine Reprogrammierung von PRR ist bereits für einige IFN-induzierende Agenzien beschrieben. Schon 2001 wurde gezeigt, dass der Vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) und auch poly(I:C) den LPS-Signalweg verstärken können (Nansen, Randrup Thomsen 2001). Die Autoren zeigten im *in vivo*-Mausmodell, dass eine Präsensitivierung mit VSV oder Poly(I:C) zu einer deutlichen erhöhten TNF- $\alpha$ -Sekretion kommt. Dieser Effekt war von Typ-1-IFN abhängig, denn der *Priming*-Effekt ließ sich in IFN-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen nicht mehr nachweisen. Eine Präsensitivierung mit rekombinanten humanen IFN- $\alpha$  konnte den gleichen Effekt wie VSV oder poly(I:C) auslösen. Es wird spekuliert, eine virale und subsequeunte bakterielle Infektion könne die Empfindlichkeit für einen septischen Schock steigern.

In dieser Arbeit konnte zwar auf transkriptioneller Ebene keine Verringerung der RIG-I- oder MDA5-mRNA festgestellt werden, was aber natürlich keinen Rückschluss auf einen möglichen posttranskriptionellen Abbau erlaubt. Es wurde allerdings berichtet, dass IFN RLH-Signalwege über eine negative Feedbackschleife beeinflussen können. Das Protein ISG15, eines der ersten identifizierten IFN-induzierten Gene, wird durch IFN, aber auch durch LPS und doppelsträngige Nukleinsäure induziert (Haas et al. 1987). Ähnlich wie Ubiquitin kann ISG15 an Proteine binden und führt zu einem Abbau dieser Proteine. ISG15

bindet unter anderem an PKR und RIG-I, baut letzteres ab und führt so zu einer verminderten Reaktion auf RIG-I-Liganden (Kim et al. 2008a).

In J774-Makrophagen spielt IFN- $\beta$  auf jeden Fall eine bedeutende Rolle, da sich der Block durch IFN-depletierende Antikörper vollständig wegtitrieren lässt. Da wir dies aber nicht in Knochenmarkszellen beobachten konnten (Daten nicht gezeigt), ist es nicht auszuschließen, dass dort auch die Bindung von poly(I:C) an RIG-I eine Rolle spielt.

#### 4.2.5. PHYSIKALISCHE EFFEKTE

In einer Veröffentlichung zeigen Takahasi et al. mit biochemischen Analysen an einem rekombinanten, aufgereinigten RIG-I-Protein, dass einzelsträngige ppp-RNA und doppelsträngiges poly(I:C) kompetitiv an RIG-I binden (Takahasi et al. 2008). Während die Bindung von ppp-RNA zu einer Aktivierung der Helikase-Domäne, einer Entfaltung des Proteins und somit auch zur Aktivierung des Signalwegs führt, kann die Bindung von poly(I:C) diese nicht auslösen. RIG-I entfaltet sich nicht und bleibt in seiner passiven Form. Dieser Effekt kann natürlich auch bei dem hier beobachteten *Blocking*-Effekt eine Rolle spielen. Um das auszuschließen, wurden die Zellen zwischen den Stimulationen sehr gründlich gewaschen – auch um eine versehentliche Transfektion des sich noch im Überstand befindlichen poly(I:C)s zu verhindern. Trotzdem kann poly(I:C) über eine längere Zeit RIG-I blockieren und somit den Block auslösen. Da lösliches IFN- $\beta$  aber eine notwendige Voraussetzung für das Auftreten des *Blocking*-Effekts in J774-Makrophagen ist, kann die Bindung von poly(I:C) an RIG-I hier allenfalls eine zusätzliche Komponente sein. Für andere Zellen, in denen der *Blocking*-Effekt beobachtet wurde, ist dies noch nicht geklärt.

#### 4.2.6. EIGENSCHAFTEN DES VERWENDETEN POLY(I:C)

In den Experimenten dieser Arbeit hat Poly(I:C) *in vitro* keine starken Zytokinreaktionen ausgelöst (Daten nicht gezeigt). Warum Poly(I:C) in manchen Experimenten starke Zytokinreaktionen hervorruft und in manchen nicht, wurde auch bereits öfter in der Literatur beschrieben und diskutiert. Der Grund dafür ist noch unbekannt, es werden unterschiedliche Längen von Poly(I:C) oder andere Unterschiede in verschiedenen Chargen



diskutiert (Dearman et al. 2009, S. 481). Die Autoren dieser Studie konnten allerdings keine Hochregulierung von CD80-Molekülen in murinen DC nachweisen.

Das in dieser Arbeit verwendete Poly(I:C)-LMW von Invivogen hat laut Hersteller eine Länge von 0,2 – 1 kb. Mian et al. berichten über große Unterschiede zwischen poly(I:C)-Zubereitungen verschiedener Hersteller und sogar zwischen unterschiedlichen Chargen der gleichen Hersteller. Poly(I:C) mit einer Länge von 0,5 – 1,5 kb konnte in humanen PBMC deutlich höhere Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine hervorrufen als Poly(I:C) mit einer Länge von 2,0 – 8,0 kb. Außerdem scheint kürzeres Poly(I:C) leichter ins Zellinnere einzudringen (Mian et al. 2013).

In verschiedenen Studien eingesetztes Poly(I:C) hat oft auch eine unterschiedliche Länge. Dies kann die zum Teil konträren Ergebnisse in der Literatur untereinander und im Vergleich zu dieser Arbeit zumindest teilweise erklären.

#### 4.2.7. DIE REPROGRAMMIERUNG IM KONTEXT EINER INFEKTION

Es erscheint auf den ersten Blick wenig sinnvoll, die Produktion des stark antiviralen IFN- $\alpha$  im Rahmen einer viralen Infektion zu drosseln, doch genau dies passiert bei dem beobachteten *Blocking*-Effekt. Dennoch gibt es mögliche Erklärungsansätze, warum ein solcher Effekt keinen Nachteil für den Organismus darstellt.

Einerseits kann die verminderte Produktion in mDCs und anderen Immunzellen möglicherweise durch pDCs kompensiert werden. Diese können, wie in dieser Arbeit beschrieben, über TLR7 und TLR9 durch den *Priming*-Effekt sogar mehr Zytokine und IFN bilden. Andererseits ist die Sekretion von IFN während einer Virusinfektion für den Organismus nicht nur vorteilhaft, denn eine übermäßige Sekretion kann zu einer Reihe von negativen Effekten führen. Dazu zählen unter anderem die Induktion der Apoptose in betroffenen Zellen und eine Rückbildung des Thymus durch eine Proliferationshemmung der dort ansässigen Immunzellen, ein Effekt, der nach Stimulation mit R848 nicht auftritt (Anz et al. 2009). IFN- $\beta$  trägt außerdem unter anderem zur Beschädigung der Epithelzellen im Rahmen einer schweren Pneumonie mit Influenza-Viren bei (Högner et al. 2013). Zwei Studien aus dem Jahr 2013 zeigen, dass sich IFN im Rahmen einer chronischen Lymphozytäre Choriomeningitis-Virus (LCMV)-Infektion schädlich auswirken können

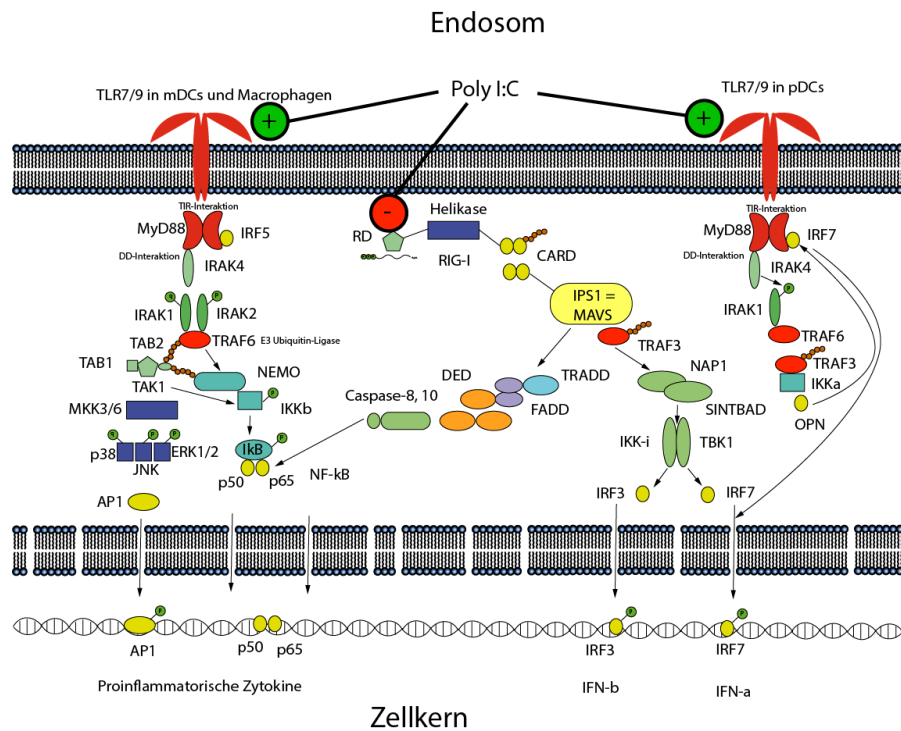
(Wilson et al. 2013) bzw. dass neutralisierende Antikörper gegen Typ-1-IFN die Infektion positiv beeinflussen (Teijaro et al. 2013). Deshalb ist eine gute Regulation der IFN-Sekretion für den Organismus wichtig, um die ungünstigen Auswirkungen einer überschießenden Sekretion zu verhindern. Dies könnte ein Grund für die Entstehung des *Blocking*-Effekts sein.

Einen weiteren Nutzen könnte der *Priming*-Effekt im Rahmen von Superinfektionen haben: Die Arbeitsgruppe um Kim beobachtete, wie in 1.2.5 ausführlich dargestellt, eine erhöhte Letalität durch erhöhtes NOD-Signaling in mit *E. coli* infizierten Mäusen, nachdem diese zuvor mit Poly(I:C) sensitiviert wurden (Kim et al. 2011). Sie diskutieren, ob diese erhöhte Zytokinproduktion den Wirt vor bakteriellen Superinfektionen schützen soll, aber in bestimmten Szenarien überreagiert.

Auch im Szenario einer einzigen Infektion kann die Interaktion der verschiedenen PRR von Bedeutung sein. Am Beispiel einer Hepatitis-C-Infektion spekulieren Kawai und Akira, die Erkennung des Virus durch RLR und die darauffolgende IFN-Sekretion in Hepatozyten könnten die erste Verteidigungslinie darstellen (Kawai, Akira 2011). Das Virus kann aber durch die Expression bestimmter Proteine die IFN-Sekretion reduzieren. In der Folge kann nun die RNA des Virus über TLR-Rezeptoren von pDCs erkannt und die IFN-Sekretion aufrechterhalten werden. Durch den *Priming*-Effekt sind diese nun in der Lage, verstärkt zu reagieren.

Typ-1-IFN können während einer viralen Infektion die Wirkung von IL12 und die Bildung von IFN- $\gamma$  behindern (Cousens et al. 1997). Auch die durch RIG-I induzierte IRF-3-Aktivierung vermindert die IL12-Sekretion und hemmt somit die Entwicklung einer Th1-Immunität (Negishi et al. 2012). Eine Unterdrückung der IFN-Sekretion durch den *Blocking*-Effekt parallel zu einer Erhöhung der IL12 Sekretion durch den *Priming*-Effekt kann in diesem Szenario synergistisch wirken, die Immunantwort in Richtung Th1 führen und die virale Immunität stärken.

Abbildung 21 zeigt eine Zusammenfassung der am *Priming*- und *Blocking*-Effekt beteiligten Rezeptoren und Signalwegen.



**Abbildung 21:** Zusammenfassung der Effekte.

Eigene Grafik. Referenzen: Takeuchi, Akira 2010; Blasius, Beutler 2010

### 4.3. SEQUENTIELLE PRR-STIMULATION UND TUMORIMMUNTHERAPIE

Die Tumorimmuntherapie mit TLR-Liganden ist ein vielversprechender Ansatz. Doch sie ist auch ein zweischneidiges Schwert. Die bereits in der Einleitung diskutierten antitumorösen Effekte basieren hauptsächlich auf der Aktivierung des Immunsystems und der Induktion der Apoptose und werden über PRR auf Zellen des Immunsystems vermittelt. Aber auch Tumorzellen können TLR exprimieren, die die Zellen zum Wachstum und so auch das Tumorstadium stimulieren (So, Ouchi 2010). Auch in der Tumorentstehung können PRR-Liganden negativ einwirken. Es wurde ein Einfluss von LPS auf die maligne Transformation von Prostata-Epithelzellen (Kundu et al. 2008) und von TLR auf die Entstehung des Magenkarzinoms beschrieben. In letzterem Fall wird dies über die Stimulation von TLR4, -5 und -9 durch *Helicobacter pylori* vermittelt (Schmausser et al. 2005).

Stier et al. führten Experimente an einem murinen Modell des kolorektalen Karzinoms durch. Dabei testeten sie eine Monotherapie mit verschiedenen TLR-Liganden, darunter LPS, Poly(I:C) und R848 einzeln und in verschiedenen Kombinationen (Stier et al. 2013a). R848 hatte hierbei die stärkste tumorhemmende Wirkung, Poly(I:C) konnte keine Reduktion des Tumorstadiums hervorrufen. Eine Kombination aus Poly(I:C) und LPS konnte das Tumorstadium im Vergleich zur Kontrollgruppe nur sehr schwach verlangsamen. Eine sequentielle Tumorthherapie wurde nicht getestet. In diesem Versuch erhielten die Tiere zweimal wöchentlich eine Gabe der Therapeutika. In einer anderen Studie zeigte sich bei simultaner Stimulation von TLR 7/8/9 eine gute Wirkung auch bei großen CT26-Tumoren (Zhao et al. 2014). Die zeitgleiche Verabreichung von R848 und poly(I:C) führte in dem in 3.3 beschriebenen Tumorexperiment allerdings zu einer hohen Letalität.

Ein Problem der systemischen Therapie mit Poly(I:C) ist die Toxizität, welche zu erhöhtem Transaminasenspiegel im Serum, Fieber und veränderten Gerinnungswerten führt (siehe 1.3.2). Diese verhindert eine häufige Applikation. Durch den *Priming*-Effekt könnte eine effektivere Immunstimulation mit verminderter Toxizität erreicht werden. Für die Transaminasen, einem klinisch etablierten Marker für eine Leberzellschädigung, konnte hier in dem verwendeten Modell gezeigt werden, dass ein sequentielles Therapiemodell nicht toxischer als seine Einzelsubstanzen ist.

Dass das *Timing* der Gabe der Immunstimulanzien in der Tumorimmuntherapie von größter Relevanz ist, konnte eine Publikation aus meiner Arbeitsgruppe zeigen (Bourquin et al. 2011). Da, wie bereits in der Einleitung erwähnt (1.2.4), eine einzelne Gabe ausreicht, um eine über mehrere Tage andauernde Toleranz gegenüber weiteren Stimuli desselben Signalwegs auszulösen, ist ein Therapieschema mit häufigen Gaben hintereinander höchst ineffektiv. Diese Toleranz ließ sich durch eine fraktionierte Behandlung umgehen: Alle fünf Tage wurden innerhalb von 24 Stunden vier Injektionen von R848 vorgenommen. In dieser Zeit hat sich noch keine Toleranz aufgebaut und es kommt zu länger anhaltenden hohen IL6- und IFN- $\alpha$ -Konzentrationen. Im Vergleich zu der Vergleichsgruppe, die R848 alle drei Tage erhielt, konnte die fraktionierte Therapie das Tumorwachstum signifikant besser kontrollieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun eine weitere Möglichkeit, den toleranten Status zu durchbrechen und die Tumorimmuntherapie mit PRR-Liganden effektiver zu machen. Durch eine abwechselnde Gabe von Poly(I:C) und R848 stellt sich keine Toleranz ein und können die Therapeutika in einer höheren Frequenz verabreicht werden. Zusätzlich kommt es nicht nur zu einem additiven Effekt von Poly(I:C) und R848, sondern sogar zu einem superadditiven Effekt, der wahrscheinlich unter anderem auf den durch den *Priming*-Effekt erhöhten Zytokinniveaus basiert. Da bei den meisten Therapieschemata, die in der Literatur beschrieben sind, ein sehr kurzer zeitlicher Abstand der Dosisverabreichungen gewählt wurde und bei Verwendung mehrerer Stimulanzien diese meist gleichzeitig gegeben wurden, blieben die Ergebnisse meist unter den Erwartungen. Die sequentielle Gabe von PRR-Adjuvantien könnte somit ein weiterer Baustein für eine erfolgreiche Tumorimmuntherapie sein.

#### 4.4. AUSBLICK

Aufbauend auf vorherigen Erkenntnissen konnten in dieser Arbeit einige Grundlagen der sequentiellen Stimulation von PRR besser erforscht werden. Ein auf diesen Grundlagen basiertes Tumorprotokoll konnte eine starke Effektivität zeigen. Doch die dahinterliegenden Mechanismen sind zu großen Teilen noch unerforscht.

In einer auf einigen Ergebnissen dieser Arbeiten aufbauenden Publikation konnte gezeigt werden, dass der *Priming*-Effekt zu einer erhöhten Th1-Antwort führt, dass er abhängig von IFN- $\beta$  ist und im Gegensatz zu einer simultanen Stimulation mit R848 und Poly(I:C) zu einer erhöhten IL12-Ausschüttung, einer erhöhten Expression von kostimulatorischen Molekülen und mehr IFN- $\gamma$  in Effektorzellen führt (Manuskript eingereicht, Daten noch nicht veröffentlicht). Auch die hohe Letalität bei einer zeitgleichen Gabe beider Adjuvantien spricht für die sequentielle Therapie. So konnten weitere Mechanismen aufgeklärt werden, die für eine Tumorummuntherapie essenziell sind.

Die systemische Tumorthherapie mit PRR-Liganden ist trotz einiger Versuche noch nicht im klinischen Alltag angekommen. Es gibt viele Probleme mit Toleranz, Dosierung und Toxizität. Außerdem wird die das Tumorstadium fördernde Rolle der TLR oft kritisch erwähnt (Pradere et al. 2013; Chatterjee et al. 2014). Hier könnte durch Ergebnisse dieser Arbeit ein möglicher Lösungsweg aufgezeigt werden. Allerdings müssen vor allem die optimale Dosierung und der Effekt auf unterschiedliche Krebsarten noch genauer erforscht werden.

Diese Arbeit behandelt die systemische Applikation von PRR-Liganden. Möglicherweise kann es aber effektiver sein, die Immunstimulanzien direkt zum Tumor zu bringen. Der erfolgreiche topische Einsatz bei Hautkrebs und kutanen T-Zell-Lymphomen suggeriert dies (Huen, Rook 2014). Hier gab es bereits einige vielversprechende Versuche mit SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln (Fan et al. 2016) und tumorspezifischen Antikörpern (Yu et al. 2013). Diese Applikationswirkungen können die systemischen Nebenwirkungen noch einmal deutlich reduzieren.

Langfristig müssen diese vielversprechenden Erkenntnisse aus Modellversuchen im Mausmodell freilich auf den Menschen übertragen und in entsprechenden Studien validiert werden. Erste hoffnungsvolle Studien mit poly(I:C)-haltigen Medikamenten und TLR7-

Liganden wurden schon durchgeführt (1.3.3). Vielleicht können die Ergebnisse dieser Arbeit helfen, den Einsatz von PRR-Liganden effektiver zu machen, um in der Zukunft eine zusätzliche, sichere und wirkungsvolle Tumorthherapie zu ermöglichen.





## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte umfassend gezeigt werden, dass die Stimulation von PRR mit poly(I:C) als Modell einer viralen Infektion zu einer Reprogrammierung in einer Reihe verschiedener Immunzellen führt. Die Reprogrammierung äußert sich in zwei Effekten:

*Priming-Effekt:* Eine verstärkte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch Stimulation von TLR7 mit R848.

*Blocking-Effekt:* Eine nahezu ausbleibende Zytokin-Antwort auf die Stimulation von RIG-I mit ppp-RNA.

Der *Priming-Effekt* in pDCs bezieht sich neben den proinflammatorischen Zytokinen IL6 und IL12p70 auch auf IFN- $\alpha$ , das in pDCs auf einen TLR7-Stimulus gebildet wird. In mDCs konnte eine Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nachgewiesen werden.

TRIF, MDA5 und PKR konnten *in vitro* als jeweils einzig verantwortliche Rezeptoren für diese Effekte ausgeschlossen werden. Auch eine Hochregulierung von TLR7 auf Ebene der Genexpression ist für den *Priming-Effekt* nicht nachweisbar. Die Abhängigkeit des *Blocking-Effekts* von löslichem IFN- $\beta$  konnte nachgewiesen werden.

Im Kontext einer viralen Infektion oder einer bakteriellen Superinfektion könnten diese Effekte zu einer effektiven zeitlichen Abfolge der Immunantwort des Wirts führen.

Mithilfe eines CT26-Tumormodells wurde schließlich nachgewiesen, dass eine Tumorthherapie mit Poly(I:C), gefolgt von R848, deutlich effektiver und nicht toxischer ist als die Therapie mit einzelnen Substanzen. Dies zeigt, dass neben der zeitlichen Abfolge (Bourquin et al. 2011) auch die Reihenfolge der eingesetzten Substanzen in der Tumorthherapie mit TLR-Agonisten eine elementare Rolle spielt. Ob durch diesen sequentiellen Therapieeinsatz unerwünschte Wirkungen reduziert werden können und inwieweit er auf andere Tumorentitäten anwendbar ist, bleibt ein spannendes Forschungsfeld.



## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signalling.  
*Nature Reviews Immunology* 2004; 7:499–511.

Alexopoulou L, Holt A, Medzhitov R, Flavell R: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.  
*Nature* 2001; 6857:732–738.

Anz D, Thaler R, Stephan N, Waibler Z, Trauscheid M, Scholz C, Kalinke U, Barchet W, Endres S, Bourquin C: Activation of melanoma differentiation-associated gene 5 causes rapid involution of the thymus.  
*Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2009; 10:6044–6050.

Arends, Tom J H, Lammers, Rianne J M, Falke J, van der Heijden, Antoine G, Rustighini I, Pozzi R, Ravic M, Eisenhardt A, Vergunst H, Witjes J: Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and activity evaluation of TMX-101 in a multicenter phase 1 study in patients with papillary non-muscle-invasive bladder cancer.  
*Clinical Genitourinary Cancer* 2015; 3:204-9.e2.

Ausubel F: Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?  
*Nature Immunology* 2005; 10:973–979.

Bagchi A, Herrup E, Warren H, Trigilio J, Shin H-S, Valentine C, Hellman J: MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists.  
*The Journal of Immunology* 2007; 2:1164–1171.

Barral P, Morrison J, Drahos J, Gupta P, Sarkar D, Fisher P, Racaniello V: MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells.  
*Journal of Virology* 2007; 8:3677–3684.

Blasius A, Beutler B: Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010; 3:305–315.  
Boon T, Cerottini J, Van den Eynde, B, van der Bruggen, P, van Pel A: Tumor antigens recognized by T lymphocytes.  
*Annual Review of Immunology* 1994:337–365.

Bourquin C, Hotz C, Noerenberg D, Voelkl A, Heidegger S, Roetzer L, Storch B, Sandholzer N, Wurzenberger C, Anz D, Endres S: Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance.  
*Cancer Research* 2011; 15:5123–5133.

Bouteiller O de, Merck E, Hasan U, Hubac S, Benguigui B, Trinchieri G, Bates, Elizabeth E M, Caux C: Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH.  
*The Journal of Biological Chemistry* 2005; 46:38133–38145.

Bowie A, O'Neill L: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products.  
*Journal of Leukocyte Biology* 2000; 4:508–514.

Broad A, Kirby J, Jones D: Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon-beta production.  
*Immunology* 2007; 1:103–111.

Brugnolo F, Sampognaro S, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F, Manuelli C, Campi P, Maggi E, Romagnani S, Parronchi P: The novel synthetic immune response modifier R-848 (R848) shifts human allergen-specific CD4<sup>+</sup> TH2 lymphocytes into IFN-gamma-producing cells.  
*The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 2:380–388.

Chan E, Kwak E, Hwang J, Heiskala M, de La Bourdonnaye, Guillaume, Mita M: Open-label phase 1b study of FOLFIRI plus cetuximab plus IMO-2055 in patients with colorectal cancer who have progressed following chemotherapy for advanced or metastatic disease.  
*Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2015; 4:701–709.

Chatterjee S, Crozet L, Damotte D, Iribarren K, Schramm C, Alifano M, Lupo A, Cherfils-Vicini J, Goc J, Katsahian S, Younes M, Dieu-Nosjean M, Fridman W, Sautès-Fridman C, Cremer I: TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer.  
*Cancer Research* 2014; 18:5008–5018.

Cheng Y-s, Xu F: Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid.  
*Cancer Biology & Therapy* 2010; 12:1219–1223.

Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R, Magdeleinat P, Mami-Chouaib F, Dieu-Nosjean M-C, Fridman W-H, Damotte D, Sautès-Fridman C, Cremer I: Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance.  
*The Journal of Clinical Investigation* 2010; 4:1285–1297.

Cousens L, Orange J, Su H, Biron C: IFN-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 2:634–639.

Dearman R, Cumberbatch M, Maxwell G, Basketter D, Kimber I: Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells.  
*Immunology* 2009; 4:475–484.

Diebold S, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa, Caetano: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.  
*Science (New York, N.Y.)* 2004; 5663:1529–1531.

Eigentler T, Kamin A, Weide B, Breuninger H, Caroli U, Mohrle M, Radny P, Garbe C: A phase III, randomized, open label study to evaluate the safety and efficacy of imiquimod 5% cream applied thrice weekly for 8 and 12 weeks in the treatment of low-risk nodular basal cell carcinoma.

*Journal of the American Academy of Dermatology* 2007; 4:616–621.

Ellis L, Cohen J, High W, Stewart L: Melanoma in situ treated successfully using imiquimod after nonclearance with surgery: review of the literature.

*Dermatologic Surgery* 2012; 6:937–946.

Fan L, Zhang Y, Wang F, Yang Q, Tan J, Renata G, Wu H, Song C, Jin B: Multifunctional all-in-one drug delivery systems for tumor targeting and sequential release of three different anti-tumor drugs.

*Biomaterials* 2016; 399–407.

Ferrantini M, Capone I, Belardelli F: IFN-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use.

*Biochimie* 2007; 6-7:884–893.

Freeman A, Al-Bussam N, O'Malley J, Stutzman L, Bjornsson S, Carter W: Pharmacologic effects of polyinosinic-polycytidylic acid in man.

*Journal of Medical Virology* 1977; 2:79–93.

Garay R, Viens P, Bauer J, Normier G, Bardou M, Jeannin J-F, Chiavaroli C: Cancer relapse under chemotherapy: Why TLR2/4 receptor agonists can help.

*European Journal of Pharmacology* 2007; 1-3:1–17.

Germano G, Allavena P, Mantovani A: Cytokines as a key component of cancer-related inflammation.

*Cytokine* 2008; 3:374–379.

Gibson S, Lindh J, Riter T, Gleason R, Rogers L, Fuller A, Oesterich J, Gorden K, Qiu X, McKane S, Noelle R, Miller R, Kedl R, Fitzgerald-Bocarsly P, Tomai M, Vasilakos J: Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and R848.

*Cellular Immunology* 2002; 1-2:74–86.

Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell R, Diamond M, Colonna M: Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus.

*Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 22:8459–8464.

Grimm E, Mazumder A, Zhang H, Rosenberg S: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes.

*The Journal of Experimental Medicine* 1982; 6:1823–1841.

Gross L: Intradermal Immunization of C3H Mice against a Sarcoma That Originated in an Animal of the Same Line.  
*Cancer Research* 1943; 5:326–333.

Haas A, Ahrens P, Bright P, Ankel H: IFN induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin.  
*The Journal of Biological Chemistry* 1987; 23:11315–11323.

Hartmann D, Adams J, Meeker A, Schneider M, Lenz B, Talmadge J: Dissociation of therapeutic and toxic effects of polyinosinic-polycytidylic acid admixed with poly-L-lysine and solubilized with carboxymethyl cellulose in tumor-bearing mice.  
*Cancer Research* 1986; 3:1331–1338.

Hartman, Lisa L R, Crawford J, Makale M, Milburn M, Joshi S, Salazar A, Hasenauer B, VandenBerg S, MacDonald T, Durden D: Pediatric phase II trials of poly-ICLC in the management of newly diagnosed and recurrent brain tumors.  
*Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2014; 6:451–457.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8.  
*Science (New York, N.Y.)* 2004; 5663:1526–1529.

Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.  
*Nature Immunology* 2002; 2:196–200.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.  
*Nature* 2000; 6813:740–745.

Högner K, Wolff T, Pleschka S, Plog S, Gruber A, Kalinke U, Walmrath H-D, Bodner J, Gattenlöhner S, Lewe-Schlosser P, Matrosovich M, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S: Macrophage-expressed IFN- $\beta$  contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia.  
*PLoS Pathogens* 2013; 2:e1003188.

Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann K-K, Schlee M, Endres S, Hartmann G: 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.  
*Science* 2006; 5801:994–997.

Hotz C, Roetzer L, Huber T, Sailer A, Oberson A, Treinies M, Heidegger S, Herbst T, Endres S, Bourquin C: TLR and RLR signaling are reprogrammed in opposite directions after detection of viral infection.  
*Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2015; 9:4387–4395.

Huen A, Rook A: Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma.

*Current opinion in Oncology* 2014; 2:237–244.

Iribarren K, Bloy N, Buqué A, Cremer I, Eggermont A, Fridman W, Fucikova J, Galon J, Špišek R, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L: Trial Watch: Immunostimulation with Toll-like receptor agonists in cancer therapy.

*OncoImmunology* 2015; 3:e1088631.

Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.

*Nature Immunology* 2004; 10:987–995.

Janeway C, Medzhitov R: Innate immune recognition.

*Annual Review of Immunology* 2002; 1:197–216.

Janeway, C A Jr: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.

*Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1989, 1–13.

Johnsen I, Nguyen T, Ringdal M, Tryggestad A, Bakke O, Lien E, Espevik T, Anthonsen M: Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling.

*The EMBO Journal* 2006; 14:3335–3346.

Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg A, Wagner H, Lipford G, Bauer S: Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848.

*Nature Immunology* 2002; 6:499.

Kalb M, Glaser A, Stary G, Koszik F, Stingl G: TRAIL+ human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: Mechanisms of Imiquimod- and IFN- $\alpha$ -mediated antitumor reactivity.

*The Journal of Immunology* 2012; 4:1583–1591.

Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody T, Fujita T, Akira S: Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5.

*Journal of Experimental Medicine* 2008; 7:1601–1610.

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii K, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh C-S, Reis e Sousa, Caetano, Matsuura Y, Fujita T, Akira S: Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses.

*Nature* 2006; 7089:101–105.

Kawai T, Akira S: Toll-like receptor and RIG-1-like receptor signaling.

*Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1:1–20.

Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.  
*Nature Immunology* 2010; 5:373–384.

Kawai T, Akira S: Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.  
*Immunity* 2011; 5:637–650.

Kawai, K., Miyazaki, J., Joraku, A., Nishiyama, H., & Akaza, H.: Bacillus Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine."  
*Cancer science* 2013, 104.1: 22-27.

Kim M-J, Hwang S-Y, Imaizumi T, Yoo J-Y: Negative feedback regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by IFN-induced ISG15 conjugation<sup>▽</sup> .  
*Journal of Virology* 2008a; 3:1474–1483.

Kim Y-G, Park J-H, Reimer T, Baker D, Kawai T, Kumar H, Akira S, Wobus C, Núñez G: Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections.  
*Cell Host & Microbe* 2011; 6:496–507.

Kim Y-M, Brinkmann M, Paquet M-E, Ploegh H: UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes.  
*Nature* 2008b; 7184:234–238.

Kirkwood J, Butterfield L, Tarhini A, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S: Immunotherapy of cancer in 2012.  
*CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2012; 5:309–335.

Krown S, Kerr D, Stewart, W E 2nd, Field A, Oettgen H: Phase I trials of poly(I,C) complexes in advanced cancer.  
*Journal of Biological Response Modifiers* 1985; 6:640–649.

Krummen M, Balkow S, Shen L, Heinz S, Loquai C, Probst H-C, Grabbe S: Release of IL12 by dendritic cells activated by TLR ligation is dependent on MyD88 signaling, whereas TRIF signaling is indispensable for TLR synergy.  
*Journal of Leukocyte Biology* 2010; 1:189–199.

Kumar H, Kawai T, Akira S: Toll-like receptors and innate immunity.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 4:621–625.

Kundu S, Lee C, Billips B, Habermacher G, Zhang Q, Liu V, Wong L, Klumpp D, Thumbikat P: The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells.  
*The Prostate* 2008; 2:223–229.



Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann J: The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.

*Cell* 1996; 6:973–983.

Lester S, Li K: Toll-Like receptors in antiviral innate immunity.

*Journal of Molecular Biology* 2013.

Liu Y, Lu N, Yuan B, Weng L, Wang F, Liu Y-J, Zhang Z: The interaction between the helicase DHX33 and IPS-1 as a novel pathway to sense double-stranded RNA and RNA viruses in myeloid dendritic cells.

*Cellular and Molecular Immunology* 2013; 1:49–57.

Longhi M, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C, Salazar A, Colonna M, Steinman R: Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4(+) Th1 immunity with poly IC as adjuvant.

*The Journal of Experimental Medicine* 2009; 7:1589–1602.

Loo Y-M, Gale M, JR: Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011; 5:680–692.

Marié I, Durbin J, Levy D: Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7.

*The EMBO Journal* 1998; 22:6660–6669.

Mian M, Ahmed A, Rad M, Babaian A, Bowdish D, Ashkar A: Length of dsRNA (poly(I:C)) drives distinct innate immune responses, depending on the cell type.

*Journal of Leukocyte Biology* 2013; 5:1025–1036.

Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A: High gradient magnetic cell separation with MACS.

*Cytometry* 1990; 2:231–238.

Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C 2008: Janeway's Immunobiology. 7. ed. / Kenneth Murphy ; Paul Travers ; Mark Walport. New York [u.a.]: Garland Science.

Nansen A, Randrup Thomsen A: Viral infection causes rapid sensitization to Lipopolysaccharide: Central role of IFN- $\alpha\beta$ .

*The Journal of Immunology* 2001; 2:982–988.

Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F, Lanzavecchia A: Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells.

*Nature Immunology* 2005; 8:769–776.

Nauts H, Fowler G, Bogatko F: A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study.

*Acta Medica Scandinavica. Supplementum* 1953:1–103.

Navi D, Huntley A: Imiquimod 5 percent cream and the treatment of cutaneous malignancy. *Dermatology Online Journal* 2004; 1:4.

Negishi H, Yanai H, Nakajima A, Koshiba R, Atarashi K, Matsuda A, Matsuki K, Miki S, Doi T, Aderem A, Nishio J, Smale S, Honda K, Taniguchi T: Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nature Immunology* 2012; 7:659–666.

Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S: The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 2008; 3:194–205.

Palamara F, Meindl S, Holcman M, Luhers P, Stingl G, Sibilio M: Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2004; 5:3051–3061.

Palm N, Medzhitov R: Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews* 2009; 1:221–233.

Pasare C, Medzhitov R: Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* 2003; 5609:1033–1036.

Paulos C, Kaiser A, Wrzesinski C, Hinrichs C, Cassard L, Boni A, Muranski P, Sanchez-Perez L, Palmer D, Yu Z, Antony P, Gattinoni L, Rosenberg S, Restifo N: Toll-like receptors in tumor immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 2007; 18 Pt 1:5280–5289.

Perrot I, Deauvieau F, Massacrier C, Hughes N, Garrone P, Durand I, Demaria O, Viaud N, Gauthier L, Blery M, Bonnefoy-Berard N, Morel Y, Tschopp J, Alexopoulou L, Trinchieri G, Paturel C, Caux C: TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN- in response to double-stranded RNA. *The Journal of Immunology* 2010; 4:2080–2088.

Pohar J, Pirher N, Bencina M, Mancek-Keber M, Jerala R: The role of UNC93B1 protein in surface localization of TLR3 receptor and in cell priming to nucleic acid agonists. *Journal of Biological Chemistry* 2013; 1:442–454.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M, van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)* 1998; 5396:2085–2088.

Pradere J-P, Dapito D, Schwabe R: The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene* 2013; 27:3485–3495.

Prehn R, Main J: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas.  
*Journal of the National Cancer Institute* 1957; 6:769–778.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R: Toll-like receptors and cancer.  
*Nature Reviews. Cancer* 2009; 1:57–63.

Reiter M, Testerman T, Miller R, Weeks C, Tomai M: Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod.  
*Journal of Leukocyte Biology* 1994; 2:234–240.

Ribatti D: From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: an historical reappraisal.  
*Immunology Letters* 2014; 1:96–99.

Robinson R, DeVita V, Levy H, Baron S, Hubbard S, Levine A: A phase I-II trial of multiple-dose polyribonucleic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors.  
*Journal of the National Cancer Institute* 1976; 3:599–602.

Rosenberg S, Yang J, Restifo N: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines.  
*Nature Medicine* 2004; 9:909–915.

Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks B, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald K: The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I.  
*Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2005; 8:5260–5268.

Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M: Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 25:11810–11813.

Samara K, Antoniou K, Karagiannis K, Margaritopoulos G, Lasithiotaki I, Koutala E, Siafakas N: Expression profiles of Toll-like receptors in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis.  
*International Journal of Oncology* 2012; 5:1397–1404.

Sato S, Takeuchi O, Fujita T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S: A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways.  
*Int. Immunol.* 2002; 7:783–791.

Scheel B, Aulwurm S, Probst J, Stitz L, Hoerr I, Rammensee H-G, Weller M, Pascolo S: Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA.  
*European Journal of Immunology* 2006; 10:2807–2816.

Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Muller-Hermelink H-K, Eck M: Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*.

*International Journal of Medical Microbiology : IJMM* 2005; 3:179–185.

Schmoll H-J, Wittig B, Arnold D, Riera-Knorrenschild J, Nitsche D, Kroening H, Mayer F, Andel J, Ziebermayr R, Scheithauer W: Maintenance treatment with the immunomodulator MGN1703, a Toll-like receptor 9 (TLR9) agonist, in patients with metastatic colorectal carcinoma and disease control after chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.

*Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2014; 9:1615–1624.

Schön M, Schön M: TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* 2008; 2:190–199.

Schulz O, Diebold S, Chen M, Naslund T, Nolte M, Alexopoulou L, Azuma Y-T, Flavell R, Liljestrom P, Reis e Sousa, Caetano: Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells.

*Nature* 2005; 7028:887–892.

Scott I, Norris K: The mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS, is cleaved during apoptosis.

*Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 1:101–106.

Siegal F, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly P, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu Y-J: The nature of the principal type 1 IFN-producing cells in human blood.

*Science* 1999; 5421:1835–1837.

Smith D, Conkling P, Richards D, Nemunaitis J, Boyd T, Mita A, de La Bourdonnaye, Guillaume, Wages D, Bexon A: Antitumor activity and safety of combination therapy with the Toll-like receptor 9 agonist IMO-2055, erlotinib, and bevacizumab in advanced or metastatic non-small cell lung cancer patients who have progressed following chemotherapy.

*Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* 2014; 8:787–796.

So E, Ouchi T: The application of Toll like receptors for cancer therapy.

*International Journal of Biological Sciences* 2010; 7:675–681.

Speiser D, Lienard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, Krieg A, Cerottini J-C, Romero P: Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909.

*The Journal of Clinical Investigation* 2005; 3:739–746.

Srivastava P, Old L: Individually distinct transplantation antigens of chemically induced mouse tumors.

*Immunology Today* 1988; 3:78–83.

Stier S, Maletzki C, Klier U, Linnebacher M: Combinations of TLR Ligands: A Promising Approach in Cancer Immunotherapy.

*Clinical and Developmental Immunology* 2013b; 1:1–14.

Suet Ting Tan, Rebecca, Lin B, Liu Q, Tucker-Kellogg L, Ho B, Leung, Bernard P L, Ling Ding J: The synergy in cytokine production through MyD88-TRIF pathways is co-ordinated with ERK phosphorylation in macrophages.

*Immunology and Cell Biology* 2013; 5:377–387.

Takahasi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, Gale M, JR., Inagaki F, Fujita T: Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses.

*Molecular Cell* 2008; 4:428–440.

Takeuchi O, Akira S: Pattern recognition receptors and inflammation.

*Cell* 2010; 6:805–820.

Taura M, Fukuda R, Suico M, Eguma A, Koga T, Shuto T, Sato T, Morino-Koga S, Kai H: TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly(I:C)-induced tumor cell apoptosis.

*Cancer Science* 2010; 7:1610–1617.

Teijaro J, Ng C, Lee A, Sullivan B, Sheehan, Kathleen C F, Welch M, Schreiber R, de la Torre, Juan Carlos, Oldstone, Michael B A: Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling.

*Science (New York, N.Y.)* 2013; 6129:207–211.

Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews.*

*Immunology* 2003; 2:133–146.

Ursu R, Taillibert S, Banissi C, Vicaut E, Bailon O, Le Rhun E, Guillamo J-S, Psimaras D, Tibi A, Sacko A, Marantidou A, Belin C, Carpentier A: Immunotherapy with CpG-ODN in neoplastic meningitis: A phase I trial.

*Cancer Science* 2015; 9:1212–1218.

Wang B, Rahbar R, Fish E: IFN: Current status and future prospects in cancer therapy.

*Journal of IFN & Cytokine Research* 2011; 7:545–552.

Wilson C, Seatter S, Rodriguez J, Bellingham J, Clair L, West M: In Vivo Endotoxin Tolerance: Impaired LPS-stimulated TNF release of monocytes from patients with sepsis, but not SIRS.

*Journal of Surgical Research* 1997; 1:101–106.

Wilson E, Yamada D, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, Aronow B, Karp C, Brooks D: Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection.

*Science (New York, N.Y.)* 2013; 6129:202–207.

Wysocka M, Robertson S, Riemann H, Caamano J, Hunter C, Mackiewicz A, Montaner L, Trinchieri G, Karp C: IL12 Suppression during experimental Endotoxin tolerance: Dendritic cell loss and Macrophage hyporesponsiveness.

*J Immunol* 2001; 12:7504–7513.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.

*Science (New York, N.Y.)* 2003; 5633:640–643.

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.

*Nature Immunology* 2004; 7:730–737.

Yu B, Mao Y, Bai L-Y, Herman, Sarah E M, Wang X, Ramanunni A, Jin Y, Mo X, Cheney C, Chan K, Jarjoura D, Marcucci G, Lee R, Byrd J, Lee L, Muthusamy N: Targeted nanoparticle delivery overcomes off-target immunostimulatory effects of oligonucleotides and improves therapeutic efficacy in chronic lymphocytic leukemia.

*Blood* 2013; 1:136–147.

Yu M, Levine S: Toll-like receptor, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses.

*Cytokine & Growth Factor Reviews* 2011; 2:63–72.

Zhao B, Vasilakos J, Tross D, Smirnov D, Klinman D: Combination therapy targeting toll like receptors 7, 8 and 9 eliminates large established tumors.

*Journal for Immunotherapy of Cancer* 2014:12.

Zhao X, Ai M, Guo Y, Zhou X, Wang L, Li X, Yao C: Poly(I:C)-induced tumor cell apoptosis mediated by Pattern-Recognition Receptors.

*Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2012; 9:530–534.

## 7. VERÖFFENTLICHUNGEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

Bourquin C, Hotz C, Noerenberg D, Voelkl A, Heidegger S, **Roetzer L**, Storch B, Sandholzer N, Wurzenberger C, Anz D, Endres S: *Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance*. Cancer Research 2011; 15:5123–5133.

Hotz C, **Roetzer L**, Huber T, Sailer A, Oberson A, Treinies M, Heidegger S, Herbst T, Endres S, Bourquin C: *TLR and RLR Signaling Are Reprogrammed in Opposite Directions after Detection of Viral Infection*. Journal of Immunology 2015; 9:4387–4395.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

Hotz C, **Rötzer L**, Völkl A, Sandholzer N, Wurzenberger C, Anz D, Endres S, Bourquin C. *Rational protocols of R848 treatment hold promise for improved tumor immunotherapy*. 4th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis, Munich, 2010.

**Rötzer L**, Hotz C, Sandholzer N, Endres S, Bourquin C: *Overcoming Toll-like receptor 7 tolerance in cancer immunotherapy: sequential activation of MyD88-dependent and independent receptors* 10th international Symposium: Biological Therapy of Cancer, Munich, 2010.

**Rötzer L**, Huber T, Sandholzer N, Endres S, Bourquin C, Hotz C: *Overcoming Toll-like receptor 7 tolerance in cancer immunotherapy: sequential activation of MyD88-dependent and independent receptors* TOLL 2011, Riva del Garda, 2011

Hotz C, Nörenberg D, Völkl A, Storch B, **Rötzer LCM**, Sandholzer N, Wurzenberger C, Anz D, Endres S, Bourquin C: *Circumventing TLR tolerance improves the efficacy of systemic cancer therapy with a small molecule TLR7 agonist* TOLL 2011, Riva del Garda, 2011





## 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

-/-	<i>knockout</i>
AK, ab	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptoren
DC	<i>Dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
G(M)-CSF	<i>Granulocyte (macrophage) colony stimulating factor</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

IFN	IFN
IL	Interleukin
IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
ISG	<i>IFN-stimulated gene</i>
KM	Knochenmark
LCMV	<i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling</i>
MDA5	<i>Melanoma-differentiation-associated gene 5</i>
mDC	myeloide dendritische Zelle
NF	Nekrosefaktor
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NU	<i>Neutralizing unit</i> (neutralisierende Einheit)
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PKR	<i>Protein kinase RNA-activated</i>
Poly(I:C)	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>

PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
R837	<i>Imiquimod</i>
R848	Resiquimod
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
RLH	<i>RIG-I-like Helicase</i>
RLR	<i>RIG-like Receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
ssDNA	einzelsträngige DNA
ssRNA	einzelsträngige RNA
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TH-1/TH-2	<i>T helper cell type 1/2</i>
TIR	<i>Toll-interleukin receptor homology domain</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VSV	Vesikulärer Stomatitis-Virus



## 9. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter und Arbeitsgruppenleiterin Frau Prof. Dr. Dr. Carole Bourquin bedanken, die mir nicht nur die Möglichkeit der Promotion über dieses spannende und aktuelle Thema bot, sondern mir auch jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt dem Betreuer dieser Promotionsarbeit Dr. Christian Hotz. Er arbeitete mich in die Laborarbeit ein und stand mir während des gesamten Promotionsprojekts jederzeit fachlich und freundschaftlich zur Seite. Durch die vielen Diskussionen konnte ich meine Arbeit oft kritisch hinterfragen und voranbringen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Stefan Endres für seine Förderung. Sein Engagement und sein außergewöhnlich hoher Einsatz für die Studenten hat ein inspirierendes und exzellentes wissenschaftliches Umfeld in der Abteilung für Klinische Pharmakologie geschaffen.

Ebenso gilt mein Dank auch Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann für die freundliche Korrektur dieser Arbeit und natürlich allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe und den Kollegen und Freunden aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie, die mir während meiner Promotionszeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Dem Graduiertenkolleg des SFB-TR 36 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Elfriede Nößner am Helmholtz-Zentrum in München danke ich für die ideelle und finanzielle Förderung meines Promotionsprojekts. Die Seminare und *Retreats* motivierten mich, stets mein Thema mit vertieftem Blickwinkel weiter zu verfolgen. Zudem danke ich dem Graduiertenkolleg 1202 der DFG für die Förderung, die ich als assoziierter Student erhielt, und die mir ermöglichte, den akademischen Austausch auch international durch Teilnahme an Konferenzen voranzubringen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Manu und meinen Freunden bedanken, die mich in meinem Promotionsvorhaben stets unterstützt, ermutigt und motiviert haben. Gerade durch diese Unterstützung konnte ich mich über diese ganze Zeit eingehend mit meinem Promotionsthema auseinandersetzen.



## 10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

**Rötzer, Laurin**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Reprogrammierung von Rezeptorsignalwegen des angeborenen Immunsystems zur Stärkung der Tumorthherapie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 08.06.2016